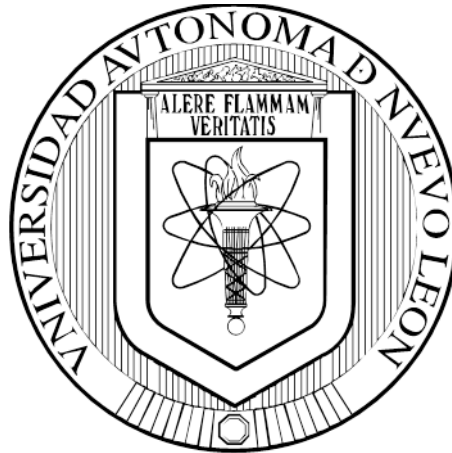


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**REPARACIÓN DE LESIONES NERVIOSAS POR XENOINJERTOS
ACELULARES HUMANOS, RECELULARIZADOS CON CÉLULAS
DE SCHWANN EN UN MODELO OVINO**

POR

LBT. FLORENCIA ESTEFANA PEDROZA MONTOYA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

Agosto, 2017

**REPARACIÓN DE LESIONES NERVIOSAS POR XENOINJERTOS
ACELULARES HUMANOS, RECELULARIZADOS CON CÉLULAS DE
SCHWANN EN UN MODELO OVINO**

Aprobación de Tesis



Dra. C Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Directora de Tesis



Dr. med. José Félix Vilchez Cavazos
Co-Director de Tesis



Dr. C. Adolfo Soto Domínguez
Miembro de la comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), bajo la dirección de la Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez, la co-dirección del Dr. med. Félix Vilchez Cavazos y la colaboración del Dr. C. Salvador Luis Said y Fernández, la MC Elsa Nancy Garza Treviño y la MCP Yadira Alejandra Tamez Mata.

Los ensayos morfológicos se realizaron en el Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, y en el laboratorio de Histotecnología del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la misma Universidad, bajo la colaboración y asesoría del Dr. C. Adolfo Soto Domínguez.

Las cirugías, la estabulación de los modelos animales y los ensayos de electrofisiología, fueron llevados a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la misma Universidad; bajo la colaboración del Dr. med. Mauricio Manuel García Pérez, el Médico Especialista José Raúl González Flores, el Dr. C. Jorge Lara Arias y del servicio profesional ofrecido en esta Facultad.

Este estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Investigación, el Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), ya que satisface los requerimientos para el cuidado y el uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y da cumplimiento al reglamento interno de investigación de la institución. Este proyecto quedo registrado con la clave OR17-00001

AGRADECIMIENTOS

A él, por TODO.

A mis padres, por que les debo todo lo que soy y, afortunadamente, no soy. Por que cada logro es un logro suyo, por amarme tal y como soy, impulsarme y apoyarme siempre a seguir mis sueños, por ser el más grande ejemplo en mi vida, por darme siempre la libertad de elegir y enseñarme que cada decisión implica compromiso y responsabilidad; por que gracias a ustedes, la vida es un camino hermoso.

A mis hermanas, Dulce y Carmen, por ser las mejores amigas que pueden existir, por amarme, escucharme, guiarme, cuidarme y apoyarme siempre.

A mi Carlitos, por ser el mejor compañero de vida, por ayudarme a crecer y acompañarme a realizar mis sueños, por amarme tal como soy, consentirme, y cuidarme siempre; por que cada vez que me sentía cansada tus palabras y tu presencia me impulsaron a seguir adelante. Por que estar a tu lado cada día representa para mi una inmensa felicidad y motivación.

A la Dra. Herminia, por representar una inspiración, ejemplo y apoyo humano y profesional en TODO momento. Por su cariño, sus palabras, su paciencia, su confianza, su compromiso, su entrega, sus consejos y su tiempo. Por darme la oportunidad y la libertad de trabajar, y por siempre escucharme y tomarme en cuenta. Por que hasta el final sigo creyendo que la decisión de elegirla como mi tutora fue la más acertada. Muchas gracias por ser una persona tan linda y un elemento clave en mi formación profesional y personal.

Al Dr. Adolfo, por su paciencia, su compromiso, sus consejos, sus enseñanzas, su confianza y todo su tiempo; sin todo su apoyo y dedicación este proyecto no hubiera sido posible. Gracias por enseñarme tantas cosas nuevas y por siempre estar dispuesto a dar más.

Al Dr. Vilchez, por su tiempo, apoyo y su asesoría a lo largo de este trabajo.

Al Dr. Mauricio, no sólo por brindarnos todo su apoyo profesional y su valioso tiempo, sino por su total disposición y entrega. Por ser un gran profesional y una bellísima persona.

A Yadi, este trabajo también es tuyo, gracias por ser la mejor compañera en este viaje, por tu cariño, tu amistad, tus palabras, por escucharme, por tu disposición, tu entrega, tu compromiso y compañía. Por que de una completa desconocida pasaste a ser mi mano, hombro y pie derecho, así como una muy buena y querida amiga.

Al Dr. Said, por que cada consejo suyo, por más pequeño, siempre fue el más acertado y le dio un nuevo rumbo a este trabajo.

A mis amigos, que se convirtieron en mi familia: Alejandro, Aidé, Frecia, Montse, Stephen, Mulan, Juanito, Iris, Enrique e Isaac. No tengo como agradecerles a cada uno por su cariño, su paciencia, sus cuidados y por todo lo bueno, divertido y maravilloso que le dieron a este momento de mi vida, SIEMPRE los voy a querer.

A Iris, por orillarme a ir a la oficina de la Dra. Herminia y tomar una de las decisiones más acertadas en la maestría.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Elsy, Carlos “Insecto”, Sara Baby, Orlando C., Carlos y Paulina, no hubiera deseado estar en otro espacio y con otras personas. Son la mejor compañía y apoyo, gracias por toda su ayuda, su cariño, por toda la diversión y por aguantarme siempre, son maravillosos y sumamente talentosos. Hicieron mi estancia en el laboratorio mejor de lo que pude imaginar.

Al Dr Raúl, al Dr Andrei, al Histopatólogo y técnico de histología Luis Botello, al Dr. Lara, al MVZ Adalberto Abrego, al MVZ Jorge Lozano, al estudiante de medicina Horacio, al Dr. Ivan Marino, Al Dr. Roberto Montes de Oca, al Dr. Humberto, al técnico Ivan Aristeo y al Departamento de Histología; gracias por su valiosa colaboración, disposición y amabilidad a lo largo de este trabajo.

A Juany, Ari, Normita, Cristy, Don Lalo, Angie, Lulú y todo el personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular que siempre estuvieron ahí con toda la disposición del mundo para apoyarnos y simplificar el camino.

A la Jefa del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, la Dra. Ana Ma. Rivas Estilla, por la oportunidad brindada.

Al Dr. Daniel Cervantes García, por ser la mayor inspiración para entrar a este posgrado.

A CONACYT, por la oportunidad y el apoyo para realizar la maestría y con ello este trabajo.

A todas las borreguitas que dieron su vida por esta causa.

¡GRACIAS INFINITAS!

DEDICATORIA

A la más auténtica y preciosa: mi Carmen. Y a la memoria de mis queridas Gela, Elena y Sofía, que aunque las perdí en el camino siempre vivirán en mí.

ÍNDICE

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El sistema nervioso	1
1.2 SNP.....	2
1.2.1 Morfología	2
1.2.2 Fisiología.....	7
1.3 Lesión del nervio periférico	10
1.3.1 Clasificación de las LNP	10
1.3.2 Degeneración walleriana y regeneración nerviosa	11
1.4 Enfoques clínicos en el tratamiento de LNP	12
1.4.1 Injertos nerviosos.....	13
1.5 La MEC como un andamio biológico	15
1.5.1 Papel de los componentes de la MEC en la regeneración nerviosa periférica.....	15
1.5.2 Injertos de nervio descelularizado	18
1.6 Descelularización de tejido nervioso.....	19
1.6.1 Descelularización con detergentes	19
1.7 Injertos de MEC de nervio recelularizado.....	20
1.8 Respuesta inmune	22
1.8.1 Injertos de MEC	22
1.8.2 CMM	23
1.8.3 CMM diferenciadas a CtS	24
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	25
CAPÍTULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28

CAPÍTULO IV. JUSTIFICACIÓN.....	29
CAPÍTULO V. HIPÓTESIS	30
CAPÍTULO VI. OBJETIVOS.....	31
6.1 General.....	31
6.2 Específicos	31
CAPÍTULO VII. DISEÑO METODOLÓGICO	32
7.1 Tipo de estudio	32
7.2 Estrategia general.....	32
CAPÍTULO VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	33
8.1 Preparación del AA.....	33
8.1.1 Procuración de nervio humano de origen cadavérico.....	33
8.1.2 Descelularización	33
8.1.3 Análisis morfológico	34
8.1.4 Análisis morfométrico y estadístico.....	36
8.2 Recelularización <i>in vitro</i> del AA	36
8.2.1 Procuración de tejido adiposo.....	36
8.2.2 Aislamiento y cultivo primario de CMM-TA	37
8.2.3 Expansión	38
8.2.4 Caracterización de CMM-TA por ICQ	38
8.2.5 Diferenciación de CMM-TA a CtS.....	41
8.2.6 Caracterización de CtS por ICQ	41
8.2.7 Recelularización <i>in vitro</i>	41
8.3 Injerto en el modelo animal.....	42
8.3.1 Características y criterios de la población	42
8.3.2 Procedimiento quirúrgico	43
8.4 Evaluación de la recuperación funcional y determinación del grado de regeneración nerviosa.....	44
8.4.1 Evaluación visual	44
8.4.2 Evaluación neurofisiológica <i>in vivo</i>	44
8.4.3 Eutanasia y recolección de piezas.....	46
8.4.4 Procesamiento de las piezas	46

8.4.5 Análisis morfológico	48
8.4.6 Análisis morfométrico y estadístico.....	48
CAPÍTULO IX. RESULTADOS	50
9.1 Preparación del andamio: análisis morfológico	50
9.1.1 Índice de descelularización.....	50
9.1.2 Conservación de la MEC	51
9.2 Preparación del andamio: análisis morfométrico y estadístico.....	52
9.2.1 Índice de descelularización.....	52
9.2.2 Análisis densitométrico	53
9.3 Recelularización <i>in vitro</i> del AA	55
9.3.1 Caracterización y diferenciación celular	55
9.3.2 Recelularización <i>in vitro</i>	57
9.4 Injerto en el modelo animal.....	57
9.4.1 Procedimiento quirúrgico	57
9.4.2 Incidentes post-quirúrgicos	59
9.5 Evaluación de la recuperación funcional y determinación del grado de regeneración nerviosa.....	59
9.5.1 Evaluación visual	59
9.5.2 Evaluación neurofisiológica <i>in vivo</i>	61
9.5.3 Eutanasia, recolección y procesamiento de las piezas	62
9.5.4 Análisis morfológico	65
9.5.5 Análisis morfométrico y estadístico.....	74
CAPÍTULO X. DISCUSIÓN	76
Preparación del AA.....	76
Descelularización	76
Preservación de la MEC	77
Recelularización <i>in vitro</i> del AA e injerto en el modelo animal.....	77
Evaluación de la recuperación funcional y determinación del grado de regeneración nerviosa.....	79
CAPÍTULO XI. CONCLUSIONES	83
CAPÍTULO XII. PERSPECTIVAS	84

BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXOS	92
1. Técnicas morfológicas para la preparación del AA	92
1.1 Técnica histológica convencional	92
1.2 Desparafinado e hidratación	93
1.3 Deshidratación, aclaración y montaje	93
1.4 Tinciones	94
1.5 Impregnación argéntica	100
2. Medios y soluciones para cultivo celular	102
2.1 Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) 1X pH 7.4	102
2.2 PBS 1X suplementado	103
2.3 PBS 1X suplementado para cultivo celular	103
2.4 Colagenasa I al 0.2%	103
2.5 Medio completo	103
2.6 Azul tripano al 0.2%	104
3. Soluciones y reactivos para inmunohistoquímica	105
3.1 Tris – buffer salino + tween 20 1X (TBST)	105
3.2 Silanizado de laminillas	105

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de Sunderland y de Seddon de las LNP	11
Tabla 2. Condiciones estandarizadas para las inmunotinciones	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sistema nervioso.....	1
Figura 2. Neurona.....	2
Figura 3. Mielinización de los axones por la CS.....	4
Figura 4. Arquitectura del haz nervioso.....	6
Figura 5. Conducción del potencial de acción.....	9
Figura 6. Técnicas microquirúrgicas en ensayos clínicos y experimentales.....	13
Figura 7. Patrones del índice funcional ciático tras 15 semanas de estudio.....	27
Figura 8. Estrategia general	32
Figura 9. Disposición de los electrodos en las pruebas neurofisiológicas y equipo de trabajo.....	45
Figura 10. Muestreo del injerto en nervio ciático.....	47
Figura 11. Análisis morfológico del AA.....	52
Figura 12. Análisis de la presencia de componentes nucleares en los grupos de estudio.....	53
Figura 13. Análisis densitométrico de mielina, axones, polisacáridos y colágeno en el nervio descelularizado comparado con el nervio control.....	54
Figura 14. Caracterización celular de las CtS	56
Figura 15. Recelularización del AA de nervio humano con CtS.....	57
Figura 16. Procedimiento quirúrgico para el grupo experimental de A.....	58
Figura 17. Procedimiento quirúrgico para el grupo experimental de XR.....	58
Figura 18. Mejoría en la extremidad intervenida a los 6 meses post-quirúrgicos	60
Figura 19. Función locomotora a los 6 meses post-quirúrgicos	60
Figura 20. Análisis de latencia a los 6 meses post-quirúrgicos.....	61
Figura 21. Análisis del pico de amplitud máximo a los 6 meses post-quirúrgicos.....	62
Figura 22. Análisis de la VC a los 6 meses post-quirúrgicos	62
Figura 23. Disposición anatómica de las piezas musculares en el cadáver	63
Figura 24. Bíceps femoral y gastrocnemio	64
Figura 25. Análisis cuantitativo de las piezas musculares	64
Figura 26. Análisis morfológico de los grupos de estudio	66
Figura 27. Detección de mielina en los grupos de estudio.....	67
Figura 28. Análisis de la intergidad axonal en los grupos de estudio.....	68
Figura 29. Detección de polisacáridos complejos en la LE de los grupos de estudio.....	69
Figura 30. Detección de fibras de colágeno en los grupos de estudio.....	70
Figura 31. Hallazgos histológicos en la periferia de las suturas a los 6 meses post-quirúrgicos	71
Figura 32. Inmunomarcaje para CS mediante S-100	72
Figura 33. Inmunomarcaje para NF-200kD	73

Figura 34. Análisis densitométrico de mielina, axones, fibras de colágeno y polisacáridos entre los grupos de estudio y el control no tratado.	75
---	----

ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
A	autoinjerto
AA	andamio acelular
ANOVA	análisis de varianza
ATRA	ácido transretinoico
βFGF	factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante-β
C	control
CEMO	células estromales de médula ósea
cm	centímetro
CMM	células madre mesenquimales
CMM-TA	células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
CS	células de Schwann
CtS	células tipo Schwann
DAB	3-3' diaminobenzidina
DW	degeneración walleriana
FD	factor de dilución
h	horas
H₂O₂	peróxido de Hidrógeno
H y E	hematoxilina-eosina
K-B	Klüver-Barrera
K⁺	ion potasio
kg	kilogramos
LE	lámina externa
LNP	lesiones de los nervios periféricos
M-G-E	Marsland-Glees-Erickson
MEC	matriz extracelular
mg	miligramos
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetro
mM	milimolar
MTCM	modificación de tricrómico de Masson
Na⁺	ion sodio
ng	nanogramos
NGF	factor de crecimiento nervioso
PAS	ácido peryódico de Schiff
PBS	solución amortiguadora de fosfatos (phosphate buffered saline)
PCS	proteoglicanos de condroitín sulfato
PDGF-AA	factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas recombinante-AA

pH	potencial de Hidrógeno
PVC	policloruro de vinilo
RPBI	residuo peligroso biológico infeccioso
rpm	revoluciones por minuto
SN	sistema nervioso
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
TA	temperatura ambiente
TBST	tris-buffer salino-tween 20
TCM	tricrómico de Masson
TRS	target retrieval solution
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
VC	velocidad de conducción nerviosa
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
XR	xenoinjerto recelularizado
µg	microgramos
µL	microlitros
µm	micrometros

RESUMEN

LBT Florencia Estefana Pedroza Montoya

Fecha de graduación: agosto 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular
Facultad de Medicina

Título del estudio:

REPARACIÓN DE LESIONES NERVIOSAS POR XENOINJERTOS ACELULARES HUMANOS, RECELULARIZADOS CON CÉLULAS DE SCHWANN EN UN MODELO OVINO

Área de estudio: Terapia Celular e Ingeniería de Tejidos

Número de páginas: 105

INTRODUCCIÓN: Las LNP representan un problema de salud que afecta la situación socioeconómica y la calidad de vida del paciente. El autoinjerto, estándar de oro en la reparación de LNP con brecha, presenta limitaciones tales como: morbilidad, incompatibilidad del sitio donante, suministro limitado y posible formación de neuromas. Estas deficiencias han conducido a la búsqueda de estrategias alternativas. **OBJETIVO:** Evaluar la capacidad regenerativa y funcional de un xenoinjerto de origen humano, recelularizado *in vitro* con CtS alogénicas, en una LNP de un modelo ovino; en comparación con un autoinjerto. **METODOLOGÍA:** Se preparó un AA a partir de nervio cadavérico humano que conservó los componentes de la MEC. A continuación, el AA se recelularizó *in vitro* con CMM-TA diferenciadas a CtS y se injertó en el modelo animal. Finalmente, se comparó la recuperación funcional y el grado de regeneración nerviosa del xenoinjerto recelularizado (XR) vs autoinjerto (A). **RESULTADOS:** Se demostró la descelularización del nervio cadavérico mediante la eliminación del componente nuclear, los restos celulares y la mielina; así como del análisis de la integridad axonal; además, se evidenció la conservación de componentes de la MEC como la LE y las fibras de colágeno. Se consiguió un porcentaje de diferenciación de CMM-TA a CtS de más del 60%, evidenciado mediante el marcador S-100. Se llevó a cabo el procedimiento quirúrgico para reparar un modelo de lesión en nervio ciático mediante A (n=6) y XR (n=6). Al cabo de 6 meses del injerto, los grupos A y XR no presentaron diferencias significativas respecto a la evaluación visual. En cuanto al músculo proximal no se observaron diferencias significativas en la relación de peso húmedo o parámetros neurofisiológicos (latencia, amplitud y VC), mientras que en el músculo distal se registraron diferencias significativas respecto a la relación de peso húmedo y en la magnitud de latencia. Sin embargo, en la evaluación morfológica no se observaron diferencias significativas entre los componentes celulares analizados en ambos grupos experimentales; aunado a esto, la arquitectura nerviosa fue consistente entre ambos grupos. **CONCLUSIONES:** **1)** Se logró la preparación de un andamio acelular, a partir de nervio cadavérico humano, que conserva los componentes de la MEC. **2)** Las CMM-TA diferenciadas *in vitro* a CtS fueron capaces de recelularizar el xenoinjerto y de reproducir el microambiente regenerativo del nervio. **3)** *In vivo*, se observó que el efecto regenerativo y funcional del A y XR fue similar; sin embargo, se requieren más experimentos, con una n mayor de animales para evaluar la posible regeneración completa.

Dra. C. Herminia Martínez Rodríguez
Directora de Tesis

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 El sistema nervioso

La función esencial del sistema nervioso (SN) es la comunicación entre los ambientes interno y externo, que se analizan e integran para producir respuestas coordinadas; la cual depende de la capacidad de las células nerviosas para recibir estímulos (excitabilidad) y la propiedad de transmitir la excitación resultante desde un punto hasta otro (conductividad)[1].

Para su análisis funcional el SN se organiza en aferente/sensitivo y eferente/motor, mientras que para su estudio desde el punto de vista anatómico se ha dividido en sistema nervioso central (SNC), que comprende el encéfalo y la médula espinal, y sistema nervioso periférico (SNP), formado por el tejido nervioso que se extiende fuera del SNC [2] (figura 1). Una de las principales diferencias entre estas divisiones, radica en que el SNP no se encuentra protegido por huesos o por la barrera hematoencefálica, lo que permite la exposición a toxinas y daños mecánicos[3, 4].

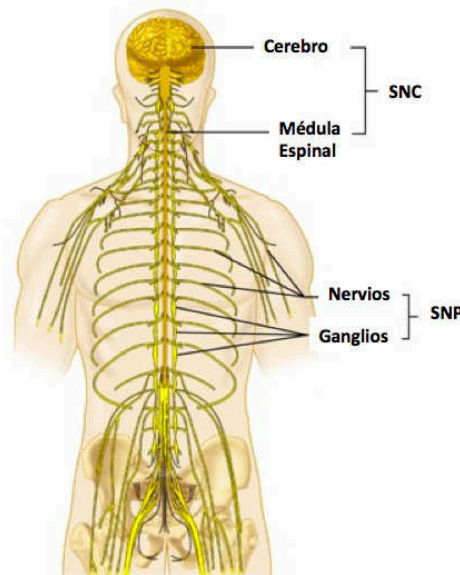


Figura 1. **Sistema nervioso.**
Tomado y modificado de Marieb *et al.*, 2008[5].

1.2 SNP

1.2.1 Morfología

El SNP está conformado por nervios y ganglios que se encuentran fuera del SNC. En el plano histológico, destacan dos tipos de células específicas: las neuronas, que realizan las funciones receptoras, integradoras y motoras del sistema nervioso, y las células de Schwann (CS), que sostienen y protegen a las neuronas; además se vinculan con los vasos sanguíneos y el tejido conectivo, los cuales pertenecen a la parte inespecífica del SN y sus funciones son exclusivamente metabólicas o mecánicas [2, 3].

Neurona

Las neuronas constituyen los elementos estructurales y funcionales del SN, sus funciones son la recepción y transmisión de impulsos nerviosos. Casi todas las neuronas se integran por un cuerpo celular, múltiples dendritas y un axón único [2] (figura 2).

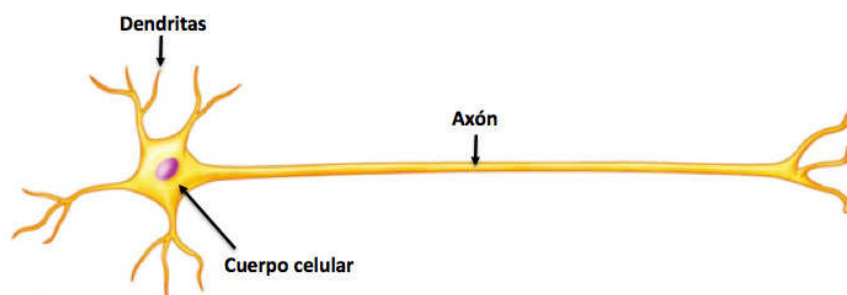


Figura 2. **Neurona**
Tomado y modificado de Marieb *et al.*, 2008[5].

El cuerpo celular o soma, es la porción central de la célula en la que se encuentran inmersos en el citoplasma: el núcleo, las mitocondrias, el aparato de Golgi, los lisosomas y, en cantidades abundantes, retículo endoplásmico rugoso y ribosomas

libres. También se encuentran otras estructuras como las neurofibrillas, neurotúbulos, inclusiones y granulaciones argentafines [2, 3].

Del soma se proyectan las dendritas, prolongaciones especializadas para recibir estímulos de células sensoriales, axones y otras neuronas. Frecuentemente, las dendritas se ramifican de tal modo que puedan recibir simultáneamente múltiples estímulos de otras neuronas [2].

Cada neurona posee un axón, prolongación de diámetro variable de hasta 100 cm de largo, que suele tener dilataciones, conocidas como terminales del axón, en el extremo o cerca de él. El axón conduce impulsos del soma a otras neuronas, músculos o glándulas, pero también recibe estímulos de otras neuronas que pueden modificar su función. Al igual que las dendritas, los axones están ramificados y las terminales del axón, que también se conocen como bulbos o botones terminales, se aproximan a otras células para formar una sinapsis, la región en la que pueden transmitirse los impulsos entre las células [3]. Esta estructura cambia de nombre, a fibra nerviosa, cuando se relaciona con las células gliales circundantes.

CS

Las células gliales ejercen funciones de protección y apoyo, tanto metabólico como mecánico, a las neuronas. En el SN puede haber hasta 10 veces más células gliales que neuronas, puesto que éstas si experimentan mitosis, y aunque las células gliales forman uniones de intersticio entre ellas, no reaccionan a impulsos nerviosos ni los propagan. Las células gliales que residen de manera exclusiva en el SNP son las CS [2, 3].

Las CS envuelven a los axones formando dos tipos de recubrimientos, mielinizados y no mielinizados. La mielina corresponde a la membrana plasmática de las CS organizada en una vaina que se envuelve varias veces en el axón. A lo largo de la longitud del axón se observan interrupciones en la vaina de mielina a intervalos regulares con exposición del axón, llamadas nodos de Ranvier. Cada nodo indica un interfaz entre las vainas de mielina de dos CS diferentes, situadas a lo largo del axón. El exterior de las CS se encuentra recubierto por una LE que se sumerge en los nodos

de Ranvier, después de una lesión nerviosa, ésta guía el nervio en regeneración hasta su localización [2]. En la figura 3 se ilustra la disposición de las CS en los axones que conforman a los nervios periféricos.

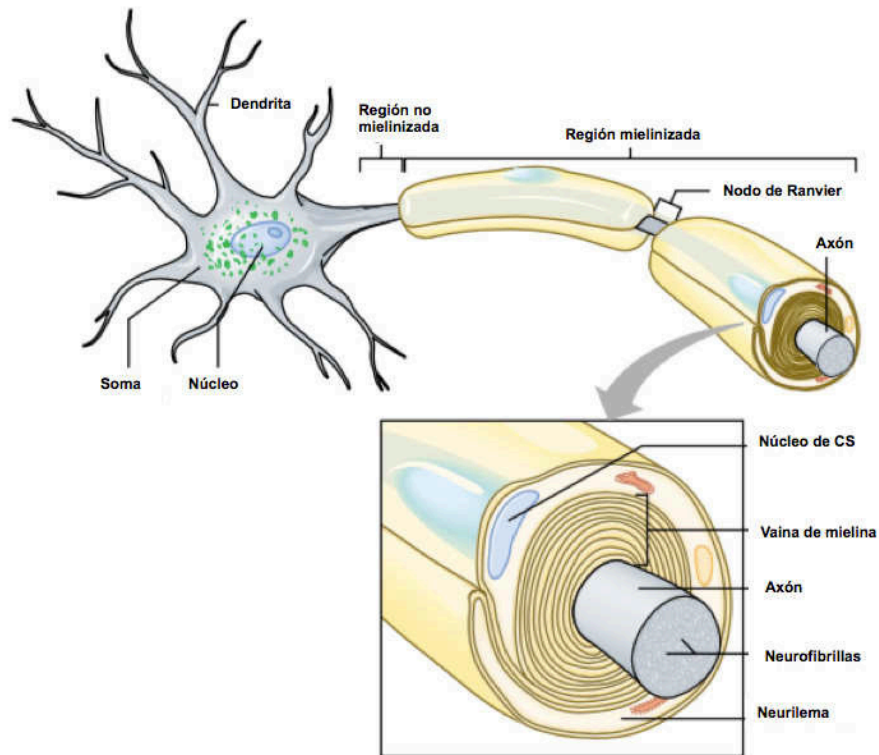


Figura 3. **Mielinización de los axones por la CS.**
Esquema que ilustra la disposición de las CS en los axones del SNP. Tomado y modificado de Shier *et al.*, 2006[6].

Estructura de los nervios periféricos

El SNP se encuentra formado por un conjunto de nervios de diversa longitud y calibre que poseen la función de percibir los estímulos de la periferia y de transportar hacia ésta la respuesta que se origine.

Los nervios periféricos son un conjunto de prolongaciones nerviosas (fibras nerviosas o axones), asociadas por medio de tejido conjuntivo, que comunican los centros nerviosos con todos los órganos del cuerpo. En su composición, se encuentran fibras aferentes, que transportan señales sensoriales al cerebro, y fibras eferentes, que

conducen señales estimulantes hacia los músculos y glándulas [3]; en su mayoría los nervios son mixtos, ya que se encuentran conformados por ambas fibras. Desde su origen, los nervios se dirigen a la estructura anatómica que van a inervar y en su trayecto se dividen en múltiples ramas terminales.

La arquitectura de los nervios periféricos consta de axones organizados en manojos, llamados fascículos, que se encuentran agrupados gracias a revestimientos de tejido conjuntivo:

Epineuro. Capa conjuntiva más externa de un nervio periférico, rodea y une los fascículos nerviosos en un solo haz. Está compuesto por tejido conjuntivo denso, principalmente formado por fibras longitudinales de colágeno[2].

Perineuro. Corresponde a una fina capa de tejido conjuntivo que envuelve a cada uno de los fascículos dentro del nervio. Está compuesto por tejido conjuntivo denso, posee un recubrimiento de la superficie interna formado por células epiteliales y lámina externa (LE). Entre las capas de células epiteliales están esparcidas fibras de colágeno longitudinales que se entremezclan con algunas fibras elásticas[2, 3].

Endoneuro. Es la capa más interna de los tres revestimientos, rodea individualmente a los axones que conforman un nervio. Se compone de tejido conjuntivo laxo que se integra con una capa delgada de fibras reticulares, fibroblastos, macrófagos residentes, capilares y células cebadas perivasculares en matriz extracelular (MEC); se encuentra en contacto con la LE de las CS. Se dispone longitudinalmente entre las CS y el perineuro[2].

En la figura 4 se esquematiza la arquitectura de un nervio periférico:

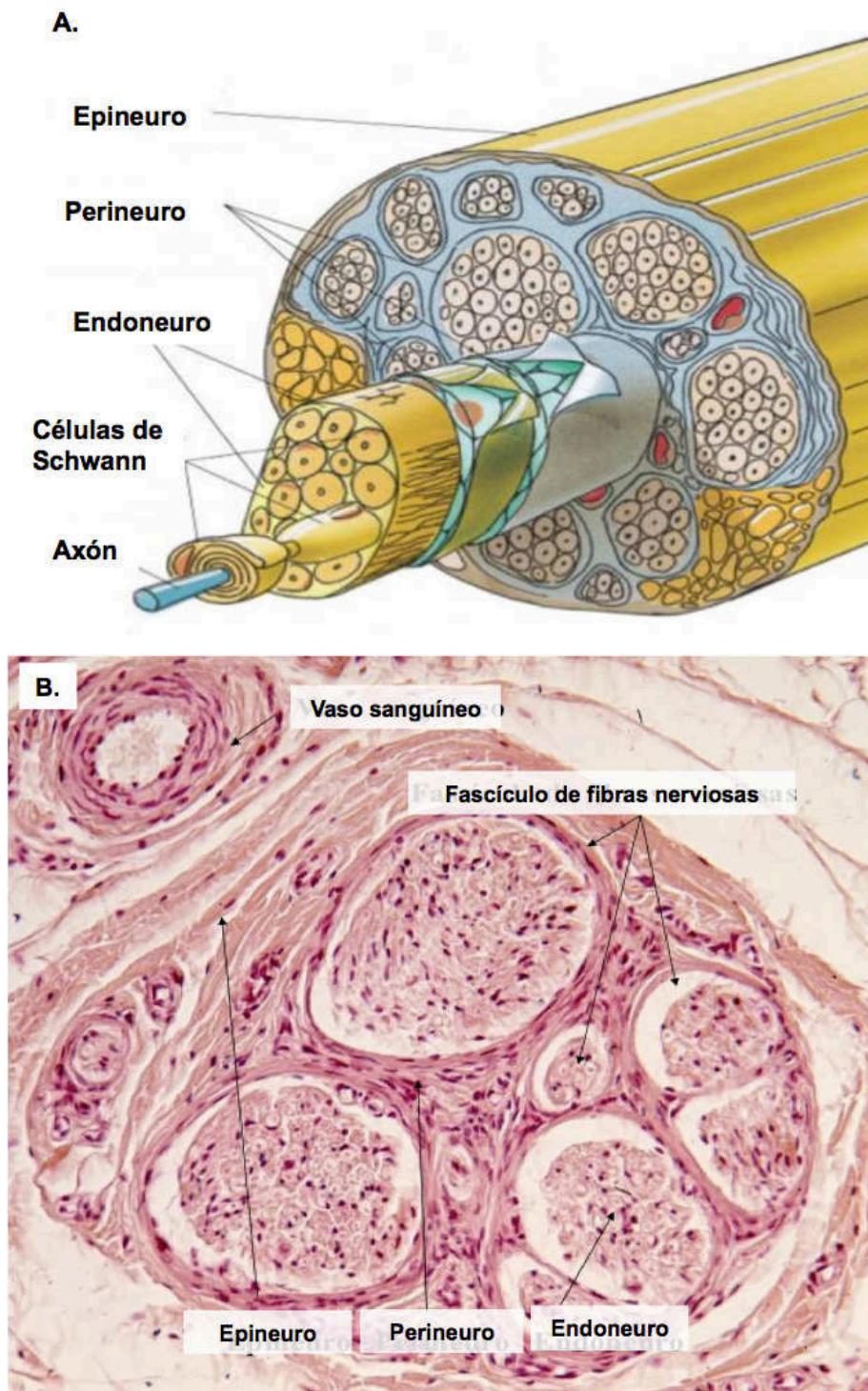


Figura 4. **Arquitectura del haz nervioso.**

A. Esquema de la estructura de una haz nervioso. **B.** Fotomicrografía de un corte transversal de nervio periférico teñido con hematoxilina y eosina. Tomado y modificado de Gartner *et al.*, 2008[2].

1.2.2 Fisiología

La función principal del SN es la comunicación, que resulta de la respuesta a un estímulo y su posterior conducción, y ésta puede efectuarse de dos maneras respecto a la respuesta de la porción estimulada del SN, sensorial o motora.

Porción sensorial. Ésta se pone en marcha cuando las experiencias sensitivas excitan a sus respectivos receptores, ya sean de carácter visual, auditivo, táctil, etc. Todas estas experiencias sensoriales pueden causar sensaciones instantáneas o pueden llegar a almacenarse y determinar acciones corporales en el futuro[7].

Porción motora. La tarea principal del SN consiste en regular las actividades del organismo, en esencia lo hace mediante tres mecanismos principales: 1) la contracción de los músculos esqueléticos, 2) la contracción de la musculatura lisa de las vísceras y 3) la secreción de sustancias químicas activas por parte de las glándulas. En conjunto, éstas se conocen como funciones motoras y los músculos y las glándulas reciben el nombre de efectores.

Generación y conducción de impulsos nerviosos (potencial de acción)

Para que se efectúe cualquiera de estas respuestas, sensorial o efectora, es necesario que el estímulo sea captado y se conduzca hasta el centro nervioso. Esto es posible gracias al potencial de acción, que se refiere a ondas transitorias que viajan a lo largo de la membrana de la fibra nerviosa, modificando su distribución eléctrica, en respuesta a un estímulo.

En ausencia de un estímulo, la membrana impide que moléculas cargadas difundan libremente a través de ella, lo cual le permite mantener el potencial de membrana en reposo. En presencia de un estímulo, este potencial varía en respuesta a cambios de permeabilidad de la membrana a iones específicos (Na^+ y K^+) y por consiguiente a cambios en las concentraciones iónicas en los compartimentos intra y extra celulares[7].

Los cambios de permeabilidad y el establecimiento y cese de corrientes iónicas, refleja la apertura y cierre de canales iónicos que forman zonas de paso a través de la

membrana. Estas proteínas responden a los cambios de potencial de membrana. En un modelo simplificado: durante el potencial de acción, el potencial en reposo se mantiene gracias al canal de K^+ . En la fase de despolarización el canal de Na^+ dependiente de voltaje se abre, causando que la permeabilidad del Na^+ supere la del K^+ . Tras unas milésimas de segundo el canal de K^+ dependiente de voltaje se abre y el canal de Na^+ se cierra gradualmente. Como consecuencia, el potencial de membrana vuelve al estado de reposo (fase de repolarización)[7].

La conducción del impulso nervioso, el desplazamiento del potencial de acción generado por un cambio en la permeabilidad a iones a lo largo de la membrana del axón de las fibras nerviosas, se encuentra influenciado por las CS. En las fibras amielínicas, el impulso se conduce como una onda continua de inversión de voltaje a una velocidad proporcional al diámetro del axón (figura 5.a). En las fibras mielínicas, las CS actúan como un aislante eléctrico y en los nodos de Ranvier, se produce el flujo de los iones. En estos nodos la membrana posee una alta concentración de canales de Na^+ sensibles a voltaje y, en consecuencia, se produce una conducción saltatoria del potencial de acción; ya que la inversión del voltaje inducida en el nodo se propaga de forma rápida y de manera pasiva por el interior del axón hasta el siguiente nodo (figura 5.b) [2]. Por lo tanto, la conducción en las fibras mielínicas es más eficiente respecto a las amielínicas.

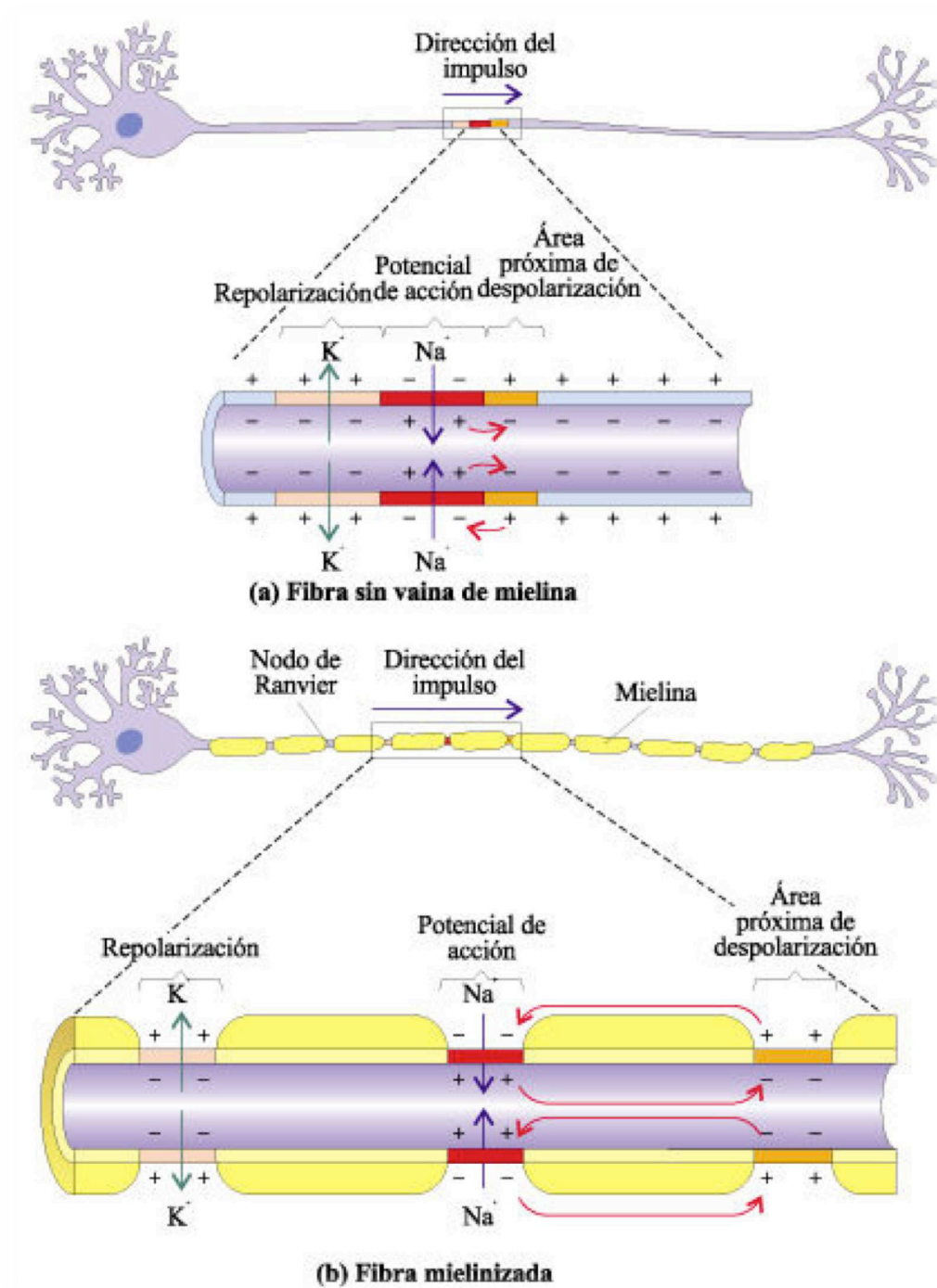


Figura 5. **Conducción del potencial de acción.**
Tomado y modificado de Kalat *et al.*, 2004[8]

1.3 Lesión del nervio periférico

Las lesiones de los nervios periféricos (LNP) resultan en la interrupción parcial o completa de la fisiología normal del nervio, generalmente, éstas ocurren de forma aguda, de manera secundaria a traumatismos. Suelen presentarse en edad productiva y comprometen la funcionalidad del miembro afectado, limitando las actividades del sujeto que las sufre; están asociadas a secuelas psicológicas, debido a las limitaciones físicas que representan y al dolor crónico que ocasionan, y conllevan a pérdidas económicas relacionadas al tiempo de recuperación, pudiendo resultar en una incapacidad permanente[9, 10].

La incidencia de estas lesiones se debe esencialmente a que los nervios periféricos son estructuras que se disponen en planos anatómicos superficiales, lo que los hace especialmente vulnerables a agentes externos. Además de los traumatismos, los principales mecanismos de lesión son: las heridas incisas, tracción, isquemia prolongada, quemaduras, congelaciones, radiaciones, lesiones eléctricas y vibración sostenida en el tiempo[11].

En México, específicamente en Monterrey, Nuevo León, se estima que hay una incidencia del 1.12% de LNP. Las extremidades superiores representan la localización con mayor frecuencia de lesión y la violencia se posiciona como la principal causa asociada[9].

1.3.1 Clasificación de las LNP

Las LNP por lo general se describen utilizando los esquemas de clasificación de Sunderland o Seddon. Seddon distingue tres grados: neuroapraxia, axonotmesis y neurotmesis[12]; mientras que Sunderland subdivide esta clasificación en cinco grados de daño de acuerdo con la continuidad de los distintos compartimentos de los nervios (endoneuro, perineuro y epineuro) (tabla 1)[13].

Tabla 1. **Clasificación de Sunderland y de Seddon de las LNP**
[10, 14]

Clasificación de Sunderland	Clasificación de Seddon	Estructuras lesionadas	Estructuras intactas
Grado I	Neuroapraxia	No hay lesión estructural	Todas
Grado II	Axonotmesis	Axones	Endoneuro Perineuro Epineuro
Grado III	Axonotmesis	Axones Endoneuro	Perineuro Epineuro
Grado IV	Axonotmesis	Axones Endoneuro Perineuro	Epineuro
Grado V	Neurotmesis	Todas: Axones Endoneuro Perineuro Epineuro	Ninguna

1.3.2 Degeneración walleriana y regeneración nerviosa

El objetivo en el tratamiento de LNP es permitir y favorecer el proceso de regeneración axonal, por lo cual resulta fundamental el conocimiento de los procesos biológicos implicados, para así favorecer el paso de los brotes axonales a través de la zona de lesión, hasta alcanzar el tejido diana, y con ello la recuperación funcional sensitiva y/o motora.

En las LNP en las que se presenta una disrupción anatómica de los fascículos axonales o del tronco nervioso completo, se produce un proceso de degeneración axonal anterógrada y retrógrada conocida como degeneración walleriana (DW)[15]. Ésta se conforma por un conjunto de hallazgos histológicos que ocurren a nivel de los cabos nerviosos donde se produce la lesión y se tiene como objetivo la formación de nuevos brotes axonales que lleguen a contactar con las estructuras axonales del cabo distal[10]. Después de la LNP, la porción distal comienza a degenerar como resultado de la actividad de proteasas y de la interrupción del flujo axoplásmico desde el soma neuronal[16]. Como resultado, el citoesqueleto se desorganiza, la membrana celular se lisa y las CS del extremo distal se despojan de los lípidos de la vaina de mielina. Después de la degeneración axonal las CS y macrófagos, residentes e infiltrados[17], se encargan de realizar la limpieza de los restos de mielina inhibitorios[18].

Posterior a la degeneración, comienza la regeneración y ésta se inicia en el extremo proximal y continúa hacia el muñón distal. Generalmente nuevos brotes axonales emanan de los nodos de Ranvier. La reinervación funcional requiere que los axones se extiendan hasta llegar a su objetivo distal, en los seres humanos la regeneración de axones se produce a un ritmo de hasta aproximadamente 1 mm por día[19]. Cuando se tratan lesiones con pérdidas significativas de tejido, pueden ser requeridos injertos que permitan la reinervación apropiada.

La regeneración en el SNP es soportada por las CS. Éstas, son un tipo de células regenerativas que pueden transdiferenciarse en respuesta al daño del nervio como parte de la DW, perdiendo su fenotipo mielinizante y convirtiéndose en células reparadoras[17]. Las CS indiferenciadas pueden proliferar y rediferenciarse durante el proceso de reparación; esta respuesta es importante para la regeneración exitosa de las LNP (neuropraxia y axonotmesis, pero no en la neurotmesis)[20]. Promueven la adhesión celular, proliferación, mielinización del axón y la secreción de factores de crecimiento, además durante el desarrollo del nervio y el proceso de regeneración, las CS depositan MEC, compuesta de diversas macromoléculas como colágeno, laminina y proteoglicanos. La MEC provee un soporte físico-estructural para el componente celular del tejido e inicia las señales bioquímicas y biomecánicas requeridas para la morfogénesis, diferenciación y homeostasis tisular[21].

1.4 Enfoques clínicos en el tratamiento de LNP

Las LNP son una condición común en la práctica clínica, ya que a pesar de los grandes avances en las técnicas de microcirugía para su reparación, aún representan uno de los problemas más desafiantes de reconstrucción en el campo de la medicina regenerativa. El éxito del tratamiento de las LNP depende de algunos factores limitantes, tales como: la edad, la herida misma, el sitio de la lesión, el tiempo entre la lesión y la intervención quirúrgica, y la técnica microquirúrgica de reparación. A su vez, la técnica microquirúrgica dependerá de la etiología del daño nervioso, una vez que se determina el sitio (proximal o distal al cuerpo de la célula) y la extensión de la lesión (pérdida nula, mínima o significativa de un segmento de nervio). Actualmente se

encuentran disponibles diversas técnicas de microcirugía para la reparación nerviosa: de coaptación de extremos (aproximación de los extremos nerviosos) de extremos, las técnicas de puenteo de los defectos de nervio: 1) injertos de nervio (autoinjerto, aloinjerto y xenoinjerto) y 2) conductos nerviosos (sintéticos y biológicos) (figura 6)[22].

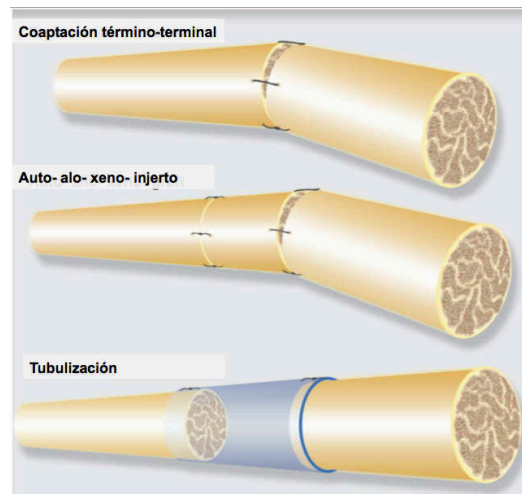


Figura 6. **Técnicas microquirúrgicas en ensayos clínicos y experimentales.**

La coaptación término-terminal es un método microquirúrgico sin tensión, indicado cuando no hay pérdida de tejido, mientras que los injertos y los métodos de tubulización microquirúrgica están indicados cuando hay pérdida significativa de tejido y la coaptación de los extremos nerviosos no es posible sin tensión. Todos los procedimientos requieren suturas epineurales para la fijación de los extremos nerviosos entre sí, al injerto o a los conductos nerviosos biodegradables. Tomado de Oliveira *et al.*, 2016[22].

1.4.1 Injertos nerviosos

Actualmente en LNP graves con brecha, debida al desbridamiento o al propio trauma, que dejan un espacio entre los extremos nerviosos e impiden su aproximación sin tensión, el estándar de oro para su reparación es el injerto autólogo (autoinjerto). El autoinjerto proporciona CS, moléculas de adhesión y componentes de la MEC, como la LE que recrea el microambiente del nervio nativo. Los nervios sensoriales se utilizan con mayor frecuencia como donantes, en particular el nervio sural. Sin embargo, hay evidencia de que las neuronas sensoriales y motoras poseen diferentes fenotipos de CS, lo que sugiere que si éstas son colocadas en el microambiente incorrecto se podría limitar su capacidad regenerativa[23]. Además, la arquitectura de los nervios sensoriales y motores con respecto al tamaño de los tubos de LE de las CS es

diferente, lo que puede desempeñar un papel importante en la regeneración nerviosa de un modelo mixto[24]. Algunos autores proponen la recolección de nervios sensoriales donantes de la misma área quirúrgica para intentar evitar una segunda intervención[25]. Sin embargo, el autoinjerto aún tiene algunas limitaciones, tales como morbilidad, incompatibilidad del sitio donante, suministro limitado y posibles neuromas que resultan dolorosos para el paciente.

Cuando la brecha excede la longitud de autoinjerto disponible, un aloinjerto de nervio cosechado de un donante cadavérico representa una alternativa para trasplante. El aloinjerto del nervio no implica los inconvenientes asociados con el autoinjerto, estándar de oro. Sin embargo, un punto a considerar sobre el uso de éste, es la inmunogenicidad que provoca el rechazo del tejido. Hay dos formas principales de evitar la inmunogenicidad: mediante la administración de agentes inmunosupresores o la descelularización del aloinjerto nervioso.

Agentes inmunosupresores. Entre los agentes inmunosupresores disponibles, el FK506 (Tacrolimus) se utiliza a menudo. Se ha presentado evidencia de que éste ejerce acciones neuroprotectoras y neurotróficas en modelos experimentales, aumentando el alargamiento de las neuritas y acelerando la tasa de regeneración nerviosa[26]; aunque posee efectos adversos potencialmente graves como infecciones, neoplasias, toxicidad y trastornos metabólicos[27]. Las terapias basadas en anticuerpos, que inducen la ausencia de respuesta inmune, representan una alternativa a la inmunosupresión no específica. Aunque la administración de anticuerpos previene el rechazo y permite la regeneración mediante el empleo de aloinjertos nerviosos, el efecto es transitorio debido a la restauración de la inmunocompetencia poco después de la suspensión de la terapia[28].

Descelularización. Los métodos de descelularización empleados a menudo en la preparación de aloinjertos nerviosos son: la irradiación, congelación-descongelación, liofilización, criopreservación, decelularización con detergentes o una combinación de ellos. Aunque los componentes celulares se eliminan mediante estos métodos, se conservan la arquitectura nerviosa y las señales de guía (MEC), como la laminina.

Además de la administración de agentes inmunosupresores y de los métodos de descelularización, las células madre derivadas de tejido adiposo (CMM-TA) han adquirido considerable atención en el campo de la medicina regenerativa, debido a su función paracrina inmunomoduladora y reparadora[29]. Por lo tanto la combinación de CMM-TA y aloinjertos nerviosos puede facilitar la supervivencia a largo plazo del aloinjerto y mejorar la regeneración del nervio; por ejemplo, en un estudio se administraron CMM-TA en xenoinjertos de nervio acelular y produjeron una depresión transitoria de la proliferación de linfocitos CD4⁺[30].

1. 5 La MEC como un andamio biológico

La MEC es el sustrato natural que proporciona una estructura de soporte y un sitio de unión para las células, además proporciona una señal biológica que juega un papel importante y tiene un impacto significativo en la adhesión celular, la migración, la proliferación, la diferenciación y la expresión génica. En el tejido nervioso periférico, la MEC contiene una gran variedad de macromoléculas, tales como colágeno (I, III, IV, V), laminina, fibronectina, proteoglicanos de condroitín sulfato y otros factores nerviosos[31-34]. En el proceso de regeneración del nervio periférico, la MEC del tejido nervioso, constituida por estas macromoléculas depositadas entre las células, constituye el microambiente para el crecimiento de las CS, que tienen un papel importante en la regeneración nerviosa.

1.5.1 Papel de los componentes de la MEC en la regeneración nerviosa periférica

Colágeno

El colágeno se refiere a proteínas estructurales que se requieren para el montaje y la organización normal de la MEC[31]. La MEC en los nervios se compone principalmente de colágeno tipo I, aproximadamente en un 90%[35], lo cual lo ha convertido en un material de uso común en la ingeniería de tejidos nerviosos. Además, como material de reparación para los nervios dañados, muestra buena biocompatibilidad[36].

Stang *et al.* implantaron CS en la superficie interna de un tubo de colágeno I / III, 7 días más tarde, estas células se adherían, sobrevivían y proliferaban en la superficie interna de los conductos[37]. Además, en otro estudio se utilizaron un conducto de colágeno y uno de silicón para unir un modelo de lesión de 10 mm y los resultados se evaluaron mediante inmunohistoquímica e histomorfometría, en puntos temporales de 4 y 8 semanas. Los resultados indicaron que el conducto de colágeno, promovió una mayor regeneración axonal, mielinización y vascularización en comparación con el tubo de silicón[38].

Laminina

La laminina es un componente prominente en la MEC del nervio periférico que mejora el crecimiento axonal *in vivo* e *in vitro*. En el SNP, la laminina es producida principalmente por las CS y está ampliamente distribuida a lo largo de la superficie celular en una banda continua. Es un componente omnipresente de la estrecha red de glicoproteínas, colágeno IV y proteoglicanos en las membranas basales[39-45]. La laminina está presente principalmente en el endoneuro y el perineuro del nervio periférico[39].

Las isoformas de laminina difieren en su expresión celular y tisular, así como en su capacidad para apoyar la unión celular, la diferenciación y el crecimiento[46]. Durante la reparación del nervio periférico, algunas lamininas y sus receptores en el sistema nervioso, están regulados positivamente. Se ha observado que las lamininas (-1, -2, -8, -10) y sus receptores (Integrina $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, DG, agrina), así como la vía de señalización desencadenada, juegan un papel importante en la regeneración nerviosa periférica[47].

En la ingeniería de tejidos, la laminina suele combinarse con otros materiales (colágeno, quitosano, etc.) para promover la reparación del nervio[48, 49]. Sin embargo, puesto que está ampliamente disperso en el SNP, la laminina podría ser un objetivo adecuado para el suministro de factores neurotróficos exógenos para reparar la lesión nerviosa.

Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína asociada a la superficie celular y uno de los principales componentes de la MEC. Contiene tres tipos de homología de secuencia (tipo I, II, III) organizadas en un dominio estructural con sitios de interacción para otras moléculas de la MEC y glicoproteínas de superficie celular[50]. La fibronectina tiene diferentes dominios funcionales que se unen directamente a varias moléculas, como fibrina, colágeno y heparina[51]. La fibronectina contiene al menos dos dominios que apoyan la adhesión celular, las neuronas del SNP pueden extender neuritas en ambos dominios[52].

En los nervios periféricos, la fibronectina producida por las CS está escasamente distribuida a lo largo de la superficie celular y se encuentra predominantemente en el perineuro. Las CS tienen un papel importante en la regeneración de los nervios periféricos y la fibronectina puede promover el crecimiento y la motilidad de éstas[53], por lo tanto la fibronectina puede mejorar los resultados de la reparación de LNP.

Proteoglicanos de condroitín sulfato

Los proteoglicanos de condroitín sulfato (PCS) son componentes importantes de la MEC y están implicados en la regulación del crecimiento axonal. En el SNP, los PCS se encuentran principalmente en la LE de las CS y en la MEC alrededor de las fibrillas de colágeno[54]. Con la remodelación de la MEC después de la LNP, la regeneración nerviosa implica un aumento en las moléculas que promueven el crecimiento axonal y la eliminación de moléculas inhibitoras. Por otra parte, Zuo *et al.* encontraron que los PCS de Schwannoma (tumor benigno compuesto por CS) y de las CS se unieron e inhibieron la actividad promotora de neuritas de la laminina[55]. Después de la LNP, los PCS inhibidores de las neuritas son abundantes y se acumulan rápidamente en el tejido endoneural que rodea las LEs de CS[56]. Por lo tanto, el aumento del nivel de PCS después de la LNP juega un papel negativo en la regeneración nerviosa.

En la ingeniería de tejidos de nervios, los andamios se tratan con condroitinasa ABC para mejorar la regeneración nerviosa. Krekoski *et al.* trataron injertos nerviosos acelulares con condroitinasa ABC y mediante inmunocitoquímica (ICQ) demostraron

que los PCS se degradaban a fondo a través de los segmentos nerviosos tratados. Los nervios acelulares tratados con condroitinasa se usaron en un modelo de lesión nerviosa de rata y la regeneración axonal en los injertos se evaluó 4 y 8 días después de la implantación por ICQ; los hallazgos indican que el tratamiento con condroitinasa mejoró las propiedades promotoras del crecimiento de los injertos de nervios acelulares[57, 58].

Los componentes de la MEC del nervio periférico desempeñan papeles de soporte estructural y transducción de señales, que son positivos o negativos para la regeneración nerviosa. Los andamios acelulares pueden mantener la mayor parte de los componentes de la MEC y mostrar un buen rendimiento en la reparación del nervio. Se propone que los injertos o andamios de nervios acelulares serían una de las mejores opciones para reparar los lesiones con brecha del nervio periférico[47].

1.5.2 Injertos de nervio descelularizado

Entre los componentes de la MEC, el colágeno proporciona principalmente soporte estructural para guiar la extensión de neurofilamentos; la laminina, la fibronectina, los PCS y los factores neurotróficos actúan como promotores o inhibidores, desempeñando diferentes papeles en la regeneración nerviosa. En el tejido del SNP, los antígenos de aloinjerto se encuentran principalmente en las CS y en la vaina de mielina. A través de un proceso de descelularización química es posible eliminar ambos componentes y conservar el colágeno (epineuro, perineuro y endoneuro) y la LE de la CS [59]. El diseño de un andamio descelularizado óptimo debe contar con 3 características principales: composición, estructura y disposición de las fibras.

Los andamios acelulares están compuestos de MEC nerviosa y poseen la arquitectura tridimensional de extensión-guía del axón. Además, la fibra de colágeno de estos andamios posee una disposición ordenada. Esta característica hace del andamio nervioso acelular un material óptimo para la reparación nerviosa.

Estos andamios se han utilizado para reparar LNP durante mucho tiempo, sin embargo, no funcionan tan bien en comparación con el autoinjerto. Muchos

investigadores han mejorado la reparación mediada por andamios acelulares a través de la adición de factores o células. El factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) ha mostrado un buen desempeño en la mejora del trasplante de nervio acelular[60]. De forma similar, se han añadido el factor de crecimiento de hepatocitos y el factor de crecimiento nervioso (NGF) a los injertos para mejorar la regeneración nerviosa[61, 62].

1.6 Descelularización de tejido nervioso

Bajo el concepto de inmunocompatibilidad entre receptor y donador, se han desarrollado técnicas para evitar el proceso de inmunosupresión, ya que éste abre las posibilidades de una infección oportunista, una neoplasia y/o de desencadenar un efecto secundario por toxicidad farmacológica[63, 64]. La descelularización de nervios pretende eliminar los componentes celulares, siendo un atractivo medio de eludir estas limitaciones mediante la reducción de la inmunogenicidad del injerto.

Actualmente se encuentran disponibles múltiples métodos para la preparación de injertos acelulares de tejido nervioso de donantes alogénicos, incluyendo preservación en frío, congelación-descongelación, irradiación y tratamiento con detergentes[65-69]. Todas las técnicas convergen en 1) reducir la inmunogenicidad del injerto por eliminación de los componentes celulares, y 2) mejorar la capacidad de regeneración a través de la conservación de la MEC.

1.6.1 Descelularización con detergentes

En 2013, Szyndkaruk *et al.* [70] analizaron diversos métodos de descelularización con base en evidencias clínicas y experimentales, entre estos métodos se encontraban: preservación en frío, congelación-descongelación, irradiación y tratamiento con detergentes. A través del estudio se observó que, a pesar de que la descelularización por detergentes presenta mayor complejidad y conlleva mayor tiempo de preparación en el andamio; era el único método que lograba eliminar el componente celular,

proporcionando un producto inmunológicamente inerte y con una capacidad regenerativa superior a los otros métodos.

Actualmente los aloinjertos preparados con detergentes se encuentran comercialmente disponibles para uso clínico en seres humanos. La preparación de injertos de nervio acelular con detergentes fue iniciada por Johnson y cols. [67], utilizando nervios humanos triturados en agitación con detergentes como Tritón X-100 y desoxicolato de sodio, y refinada por Sondell[68]. Estudios *in vivo* de injertos acelulares de 1 cm, demostraron que estos se encontraban bien integrados en el huésped, mostraban tolerancia inmune y apoyaron la regeneración del axón[68].

Posteriormente, Hudson y cols. optimizaron un protocolo basado en detergentes, en su evaluación morfológica sistemática de un andamio nervioso acelular e implementaron una escala de clasificación histológica de cinco puntos con base en varios criterios morfológicos de preservación de la MEC[71]. La integridad de la LE fue superior en el injerto preparado con una nueva combinación de tres detergentes: Tritón X-200, sulfobetaína-16 y sulfobetaína-10, en comparación con los dos detergentes utilizados previamente por Sondell. Estos injertos acelulares optimizados mostraron un potencial de regeneración más fuerte que el protocolo anterior de Sondell[67, 71]. Las densidades de axón de Hudson fueron significativamente más altas que las de Sondell y los aloinjertos tratados con congelación-descongelación. La evaluación de la recuperación funcional mediante el índice funcional ciático a 1 año, proporcionó apoyo adicional a la superioridad del injerto optimizado[72]. El protocolo refinado de Hudson *et al.* logró la eliminación de restos celulares y el mantenimiento de la MEC. El método de Hudson en combinación con el tratamiento de condroitinasa ABC, para eliminar el condroitín-6-sulfato que inhibe la regeneración, condujo a la comercialización del aloinjerto clínico Avance de AxoGen[73].

1.7 Injertos de MEC de nervio recelularizado

La diferencia sustancial entre los injertos acelulares y los autólogos son las CS, factor clave en la regeneración del nervio periférico. Las CS mejoran la reparación de los

nervios periféricos, sin embargo los recursos limitados y el rechazo del aloinjerto restringen su uso[74].

Las células madre mesenquimales (CMM) han sido exitosa y ampliamente utilizadas en materia de reparación nerviosa, esto se debe a que presentan una serie de características que aportan los componentes ideales para organizar la regeneración nerviosa. Las CMM poseen la cualidad de tener un característico crecimiento adherente y expansión *in vitro*, además de que ofrecen la posibilidad de su caracterización a través de varios marcadores tanto de selección positiva como negativa. A la par de estas características las CMM presentan dos propiedades que las consagran para su uso en la reparación nerviosa: 1) pluripotencia, la cual les confiere la capacidad de diferenciarse a diversos linajes celulares tales como adipocitos, osteoblastos, condrocitos, miocitos, neuronas y células gliales; y 2) funciones paracrinas, que ejercen sobre las células y tejidos adyacentes, que van desde la inmunomodulación y antiapoptosis, hasta el crecimiento celular[75].

Entre los tipos de células madre, las células estromales de médula ósea (CEMO) han sido ampliamente estudiadas. Los aloinjertos nerviosos acelulares implantados con CEMO han mostrado una buena capacidad para puentear los defectos nerviosos periféricos[76-78]. Sin embargo, a causa de que las CEMO autólogas se cosechan por aspiración de la médula ósea, lo que causa sufrimiento al paciente, y que la capacidad de proliferación y número de CEMO disminuye con el envejecimiento, la investigación se ha enfocado en otras fuentes de células madre para realizar una cosecha menos invasiva. Tales fuentes incluyen tejido adiposo, piel, folículos capilares y cordón umbilical humano[79]. El cuerpo humano es rico en tejido adiposo y las CMM-TA pueden aislarse fácilmente en grandes cantidades a partir de tejido adiposo autólogo. Se han construido injertos nerviosos con nervios acelulares alo/xeno-génicos y CMM-TA autólogas para reparar defectos nerviosos; lo cual representa un área de oportunidad prometedora para reemplazar al autoinjerto en la reparación de LNP [33]. Diversos estudios apoyan el empleo de CMM en la reparación de lesiones nerviosas, evidenciando que los injertos recelularizados demuestran una capacidad de regeneración axonal y función nerviosa equiparable al autoinjerto[80-84].

Adicionalmente, otros trabajos de investigación, demuestran que los injertos recelularizados han tomado auge gracias al impacto de los resultados en los modelos animales de experimentación[80, 82-84]. Actualmente este procedimiento se realiza con CMM que han sido previamente diferenciadas *in vitro* a CS y se ha evidenciado que la regeneración axonal, la remielinización y la función nerviosa son más eficientes en los injertos recelularizados con CS, en comparación con el uso exclusivo del andamio de MEC, el andamio recelularizado con CMM-TA y el autoinjerto. Lo anterior se debe a las características intrínsecas de estas células; ya que, como se ha tratado anteriormente, guían y soportan la reparación, contribuyendo al ambiente permisivo para el crecimiento y la regeneración axonal.

1.8 Respuesta inmune

1.8.1 Injertos de MEC

Las secuencias de aminoácidos y la estructura cuaternaria de muchos de los componentes de la MEC de mamíferos, como el colágeno, se encuentran altamente conservados entre especies[85]. Este alto grado de homología de secuencias es una de las razones por las cuales la MEC alogénica o xenogénica, puede funcionar como andamio sin incitar una respuesta inmune inflamatoria destructiva.

La preparación de andamios de MEC para su uso terapéutico, implica la descelularización del tejido. La ausencia del componente celular y, por tanto, la ausencia de todos los epítopes celulares asociados, presenta un tipo de "injerto de tejido" significativamente diferente al que se presenta típicamente con injertos autógenos, alogénicos o xenogénicos de órganos enteros. La muerte de las células asociadas con cualquier injerto de tejido se acompaña de la liberación de productos celulares que provocan inflamación y de las respuestas locales y sistémicas previsibles asociadas y bien estudiadas. Un andamio de MEC contiene sólo las proteínas constitutivas de ésta y sus productos de degradación como estímulos potencialmente antigénicos o inflamatorios. Las respuestas inflamatorias e inmunológicas a la MEC solo son claramente diferentes de las observadas cuando las células están incrustadas

dentro de la MEC, la muerte celular y los restos celulares son componentes de la respuesta del huésped[86].

Se ha demostrado que la descelularización química por detergentes, elimina todas las células y degrada cualquier resto de ácido nucleico mayor a 300 pares de bases, dejando los factores de crecimiento constitutivos tales como bFGF y VEGF biológicamente activos[87].

1.8.2 CMM

El fenotipo inmune de las CMM (ampliamente descrito como MHC I⁺, MHC II⁺, CD40⁺, CD80⁺, CD86⁺) se considera no inmunogénico y, por lo tanto, su trasplante a un huésped alogénico puede no requerir inmunosupresión. El MHC I puede activar a las células T, pero, con la ausencia de moléculas coestimuladoras, no se compromete una señal secundaria, dejando a las células T en un estado anérgico[88]. Muchos estudios también le han atribuido propiedades inmunosupresoras a las CMM, específicamente la capacidad de modular funciones de las células T, incluyendo la activación celular[89, 90]. Esta supresión parece ser independiente de la correlación de MHC entre las CMM y células T. Algunos informes han demostrado que el contacto directo célula-célula es necesario para la supresión[91], mientras que otros han demostrado que la actividad supresora depende de un factor soluble[89, 92]. También se ha demostrado que las CMM poseen propiedades inmunomoduladoras que deterioran la maduración y la función de las células dendríticas y que las CMM humanas inhiben la proliferación, diferenciación y quimiotaxis *in vitro* de las células B humanas[93-96]. Además se ha observado que las CMM también pueden afectar las funciones de neutrófilos y macrófagos, mediante la inhibición de la apoptosis de reposo y las células activadas[97].

En resumen, las CMM modulan diversos aspectos de la inmunidad innata y adaptativa, ejerciendo funciones inmunomoduladoras, tanto *in vivo* como *in vitro*, en un amplio rango de células inmunocompetentes, incluyendo las células presentadoras de antígenos, linfocitos T, linfocitos B y células NK[75, 98-100].

1.8.3 CMM diferenciadas a CtS

La terapia celular autóloga es una técnica que ha sido exitosamente empleada, utiliza las células de un individuo, éstas se cultivan y se expanden fuera del cuerpo y se reintroducen en el donante. Las ventajas de este enfoque incluyen la minimización de riesgos derivados de reacciones inmunológicas sistémicas, bio-incompatibilidad y transmisión de enfermedades asociadas con injertos o células no cultivadas del individuo[101].

En modelos experimentales, defectos de nervios periféricos han sido eficientemente tratados con andamios nerviosos (alogénicos y xenogénicos) recelularizados con CMM autólogas y diferenciadas a CS [33, 80-83]. Mientras tanto, Hermanns y cols. analizaron la inmunogenicidad y la supervivencia de suspensiones de CS alogénicas y xenogénicas implantadas en la lesión de una fibra del SNC en ratas Wistar [102]. En este estudio los resultados demostraron que no hay reacciones inmunes en curso marcadas para las suspensiones implantadas de CS heterogéneas y que la supervivencia a largo plazo de CS de especies cruzadas se puede lograr en ausencia de cualquier tratamiento inmunosupresor. En otro estudio, Mosahebi y cols. compararon los efectos de un trasplante alogénico de CS contra uno singénico en la reparación de una LNP sin inmunosupresión[103] y se evidenció que las CS alogénicas mejoraron la distancia de regeneración axonal y no condujeron a una respuesta inmune deletérea.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

En 1998, Sondell *et al.*[68] desarrollaron un método de descelularización que consistía en lavados con agua desionizada y detergentes (Tritón X-100 y desoxicolato de sodio) bajo el cual se logró evidenciar, con base en pruebas morfológicas, la descelularización de tejido nervioso y la conservación de los componentes de la MEC. A través del tiempo, diversos investigadores en el campo de la reparación de LNP, han seguido implementando exitosamente esta técnica en la preparación de andamios nerviosos para su posterior injerto en modelos animales experimentales [80, 83, 84].

En 2010 Yang *et al.*[104] llevaron a cabo la preparación de un andamio acelular (AA) a partir de nervio de origen humano, mediante el protocolo de descelularización de Sondell *et al.* En este mismo año, Muir *et al.* emplearon el método de descelularización de Sondell optimizado por Hudson *et al.*[71] y lo enriquecieron con el tratamiento de condroitinasa ABC, para eliminar el condroitín-6-sulfato que inhibe la regeneración. Esto condujo a la comercialización del aloinjerto clínico Avance de AxoGen[73].

A partir de estos hallazgos, diversos grupos de investigación en China y Estados Unidos de América han implementado exitosamente esta clase de andamiaje en el ámbito clínico. En 2012 Brooks *et al.* realizaron un estudio con aloinjertos clínicos Avance de AxoGen en 74 pacientes, reconstruyendo nervios sensoriales, motores y mixtos con brechas de entre 5 y 50 mm. En este trabajo, se alcanzaron niveles de recuperación significativos en el 87% de los sujetos con reportes cuantitativos; respecto al tipo de nervio se observó recuperación funcional en el 89% de los nervios sensoriales, 77% en mixtos y 86% en lesiones de nervio motor [105]. Mientras que en 2015 Li *et al.*[106] trataron un total de 15 casos con 18 defectos nerviosos digitales, mediante los aloinjertos de nervio acelular humano, producidos por la compañía de servicios médicos Guangzhou Zhongda en China. Con aloinjertos de la misma compañía, en el 2016, Zhu *et al.*[107] le dieron seguimiento a un total de 64 pacientes después de la reparación de brechas de 10-60 mm de longitud en la mano y la extremidad superior y encontraron que esta estrategia es eficaz para reparar defectos de brecha corta, en especial para una distancia <30mm.

En este mismo ámbito, la terapia celular aplicada en injertos nerviosos acelulares, para la reconstrucción de defectos nerviosos, ha sido ampliamente estudiada en modelos animales de experimentación. Para ello, como se ha mencionado anteriormente, se han empleado CMM y CMM diferenciadas *in vitro* a CS. Este tipo de terapia se ha aplicado con el afán de igualar y/o mejorar los resultados que brinda el autoinjerto, estándar de oro en la reparación de LNP, y de mitigar sus deficiencias. En el año en curso (2017) Zachary *et al.* reportaron por primera vez, la reconstrucción de 2 defectos en nervio ciático por autoinjerto suplementado con CS autólogas, a largos tiempos de seguimiento (12 y 36 meses), ambos pacientes mostraron mejoría significativa tanto en la función motora como sensorial. Este estudio demostró la seguridad preliminar y la eficacia del trasplante de CS para la reparación de s[108].

A pesar de que actualmente, en países como China y Estados Unidos de América, ya se encuentran a la venta aloinjertos de nervio humano descelularizado para su uso clínico, éstos no están disponibles en nuestro país y el costo que implicaría su importación sería muy elevado.

Con base en lo anterior, nuestro equipo de investigación se ha enfocado en el estudio de reparación de LNP a partir del uso de terapia celular e injertos de MEC. El primer acercamiento de nuestro grupo se centró en lograr la diferenciación de CMM-TA a células tipo Schwann (CtS), mediante su interacción con factores de crecimiento[109]. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio en el cual un grupo de ratas Wistar fue sometido a la reparación de una brecha de 15mm en una lesión del nervio ciático. Esto se llevó a cabo mediante aloinjertos de MEC, que fueron preparados siguiendo una modificación del protocolo de descelularización propuesto por Sondell *et al.*[68]. En el estudio se analizaron los siguientes grupos: 1) Sham, 2) Autoinjerto, 3) Aloinjerto de MEC y 4) Aloinjerto de MEC recelularizado con CMM-TA alogénicas diferenciadas *in vitro* a CtS. Al cabo de 15 semanas, en el análisis funcional, se observó una tendencia de mejoría en los grupos 3 y 4, superiores al autoinjerto (grupo 2) (figura 7). Respecto a los hallazgos morfológicos analizados, se observó que los grupos 3 y 4 presentaron una diferencia estadísticamente significativa respecto a la remielinización en el cabo proximal; y en el cabo distal, los grupos 2 y 3 evidenciaron una remielinización menor en comparación con el grupo control, mientras que la diferencia frente al grupo 4 no fue estadísticamente significativa. Aunado a este análisis, se comparó la

remielinización en el cabo distal de los grupos experimentales 3 y 4 respecto al estándar de oro (grupo 2) y se observó que el grupo 4 presentó una diferencia estadísticamente significativa; lo cual demuestra la superioridad regenerativa del aloinjerto recelularizado, bajo estas condiciones experimentales [110, 111].

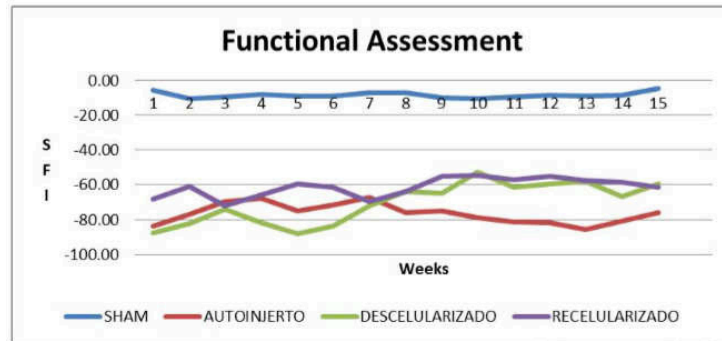


Figura 7. **Patrones del índice funcional ciático tras 15 semanas de estudio**
Tomada de García-Pérez et al., 2016

Los alentadores resultados de nuestro grupo de investigación incentivan la iniciativa de traer esta tecnología a la clínica mexicana; además, el Hospital Universitario “José E. González” cuenta con el Banco de Hueso y Tejidos, y este servicio podría ser clave en la producción y aplicación de aloinjertos de MEC de nervio humano en el ámbito clínico a nivel nacional. Sin embargo, previo a su aplicación clínica, aún es necesario escalar el modelo experimental a animales más grandes para corroborar su seguridad y eficiencia antes de probarlos en la clínica.

CAPÍTULO III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las LNP representan un problema de salud que afecta la situación socioeconómica y la calidad de vida del paciente. El autoinjerto, estándar de oro en la reparación de LNP con brecha, presenta limitaciones tales como: morbilidad, incompatibilidad del sitio donante, suministro limitado y posible formación de neuromas; estas deficiencias han conducido a la búsqueda de estrategias alternativas.

El empleo de un andamio descelularizado, que conserve la MEC, en la reconstrucción de LNP con brecha, se ha figurado como un campo prometedor, puesto que elimina las deficiencias del estándar de oro y su capacidad regenerativa ya ha sido comprobada. Sin embargo, a pesar de que ya se encuentran comercialmente disponibles aloinjertos de MEC para su uso clínico, estos no están disponibles a nivel nacional y su importación representaría un incremento significativo en los costos asociados al tratamiento; derivando en un obstáculo entre el paciente y su calidad de vida. Asimismo, aunque la fuente de obtención de injertos es cadavérica, esto sigue representando una fuente limitada respecto al número de donadores y la demanda en materia de reparación.

Por otra parte, la implementación de terapia celular con CS autólogas ya ha sido exitosamente probada, sin embargo; la cosecha de estas células requiere de una biopsia de nervio autólogo, lo que requiere de una biopsia de nervio del mismo paciente, mostrando las mismas limitaciones del autoinjerto, ya que se requiere de una intervención quirúrgica y su preparación representa un aumento en el tiempo de espera para la reparación.

CAPÍTULO IV. JUSTIFICACIÓN

El éxito observado en el uso de MEC de nervio como estrategia alternativa al autoinjerto en la reconstrucción de LNP con brecha, nos incentiva a poner disponible esta tecnología en el país a costos accesibles para el paciente.

Hasta la fecha el uso de CtS no ha sido probado en la clínica, y su uso en combinación con andamios de MEC representa una estrategia prometedora.

Nuestro equipo de investigación ya ha probado exitosamente el uso de esta tecnología en un modelo murino (aloinjertos recelularizados), sin embargo es necesario escalar el modelo experimental y, además, resulta importante comprobar la seguridad en el uso de xenoinjertos de MEC, pues ampliarían significativamente la fuente de materia en reparación.

Con base en ello, en este trabajo se evaluó el uso de MEC xenogénica en combinación con el uso de CtS de fuente alogénica, lo cual implica ampliar la disponibilidad en materia de reparación y conlleva menor tiempo de espera, respecto a las estrategias disponibles. Aunado a esto, se dio el primer paso para estandarizar la preparación de un injerto de nervio de origen humano a nivel nacional.

CAPÍTULO V. HIPÓTESIS

Un xenoinjerto de origen humano, recelularizado con CMM-TA diferenciadas *in vitro* a CtS, posee una capacidad regenerativa similar a la del autoinjerto (estándar de oro en reparación).

CAPÍTULO VI. OBJETIVOS

6.1 General

Evaluar la capacidad regenerativa y funcional de un xenoinjerto de origen humano, recelularizado *in vitro* con CtS alogénicas, en una LNP de un modelo ovino, en comparación con un autoinjerto.

6.2 Específicos

- 1) Preparar un AA a partir de nervio cadavérico humano que conserve los componentes de la MEC.
- 2) Recelularizar *in vitro* el andamio con CMM-TA diferenciadas a CtS e injertarlo en el modelo animal.
- 3) Comparar la recuperación funcional y el grado de regeneración nerviosa del xenoinjerto recelularizado (XR) vs autoinjerto (A).

CAPÍTULO VII. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 Tipo de estudio

Este protocolo corresponde a un ensayo pre-clínico controlado, clasificado por su diseño como: piloto, prospectivo, analítico, comparativo y no ciego.

7.2 Estrategia general

En la figura 8 se muestra la estrategia general que se llevó a cabo para la preparación del AA de nervio humano y de las CtS, obtenidas a partir de la diferenciación *in vitro* de CMM-TA de ovino, para su posterior injerto y evaluación en el modelo animal experimental.

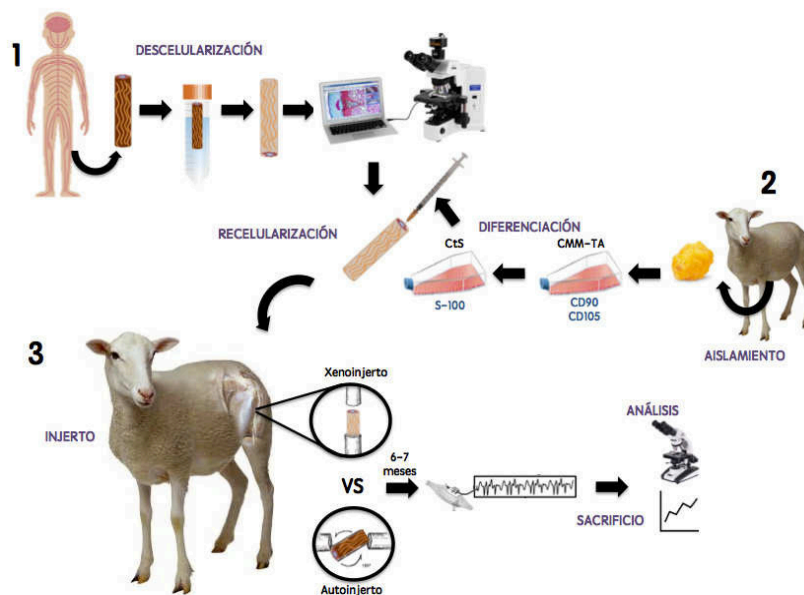


Figura 8. Estrategia general

1. Se llevó a cabo la preparación del AA a través de la descelularización de nervio humano de origen cadavérico, posteriormente se verificó el proceso con una serie de pruebas morfológicas. 2. A partir de tejido adiposo de ovino, se aislaron CMM y fueron sometidas a un proceso de diferenciación a CtS; la identidad de ambas estirpes celulares se comprobó mediante inmunomarcaje. 3. Las CtS se sembraron en el AA y este fue injertado en un modelo ovino, al cabo de 6 meses se evaluó su capacidad regenerativa y funcional en comparación con el autoinjerto.

CAPÍTULO VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Preparación del AA

8.1.1 Procuración de nervio humano de origen cadavérico

Se procuró el nervio ciático de donadores cadavéricos humanos, los cuales fueron preservados en buffer PBS 1X pH 7.4 (anexo 2.1) a 4°C para su traslado y hasta su uso posterior.

8.1.2 Descelularización

Los nervios se limpiaron retirando la mayor cantidad posible de tejido blando, éste se manejó como residuo peligroso biológico infeccioso (RPBI) según indica la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Enseguida, bajo condiciones de esterilidad, los nervios fueron segmentados en fragmentos de aproximadamente 20 mm [69, 104, 107] para ser sometidos al método de descelularización optimizado por García-Pérez *et al.*, 2016 [110]: los segmentos de nervio se lavaron con agua destilada estéril por 10h, en este periodo el agua fue sustituida cada 2h; enseguida se expusieron a una solución acuosa de Tritón™ X-100 (Sigma-Aldrich®, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA) al 3% durante toda la noche y se continuó con un periodo de 24h en una solución acuosa de desoxicolato de sodio al 4% (Sigma-Aldrich®). Este proceso se repitió por 15 días y al finalizar se realizó un lavado con agua destilada para almacenar los nervios en buffer PBS 1X, pH 7.4 a 4°C, hasta su uso. Este procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad, a temperatura ambiente (TA) y en agitación constante a 500 rpm.

8.1.3 Análisis morfológico

Los nervios descelularizados y controles (nervios no procesados) se fijaron (anexo 1.1.I) y se procesaron mediante la técnica histológica convencional (anexo 1.1). para realizar las siguientes tinciones histológicas e histoquímicas:

Hematoxilina-eosina (H y E)

Se llevó a cabo la técnica descrita en el anexo 1.4a. Esta tinción es empleada para analizar el grado de descelularización del nervio, gracias a que la hematoxilina (catiónica o básica) permite observar el núcleo (estructura ácida o basófila) de las células remanentes en tonos azul y violeta, diferenciándose del citoplasma (componente básico o acidófilo) teñido en tonos rojo a rosado por la eosina (de naturaleza aniónica o ácida).

Tricrómico de Masson (TCM)

Para esta tinción se llevó a cabo el protocolo descrito en el anexo 1.4b. TCM se emplea para evaluar la conservación de la MEC, puesto que permite visualizar en color azul a las fibras de colágeno tipo I, contrastando con el citoplasma en rojo y el núcleo lila/marrón.

Modificación del TCM (M-TCM)

Se siguió el protocolo descrito en el anexo 1.4c. Esta tinción se empleó para llevar a cabo un análisis respecto a la conservación del colágeno tipo I, componente de la MEC, en donde las fibras pueden observarse en color azul.

Klüver-Barrera (K-B).

Para llevar a cabo esta técnica se siguieron los pasos descritos en el anexo 1.4d. Esta histoquímica se emplea para evaluar el grado de conservación de la vaina de mielina, perteneciente a las células gliales del SNP (CS). La prueba permite la detección de la mielina, gracias a la afinidad del luxol fast blue por los lípidos de la vaina.

Ácido peryódico de Schiff (PAS)

Se siguió el protocolo descrito en el anexo 1.4e. Esta técnica es utilizada para evaluar el estado de la MEC; puesto que permite observar la LE. Ésta se tiñe de rojo-púrpura gracias a la afinidad del reactivo de Schiff por los grupos aldehído de los hidratos de carbono, que se logra diferenciar del núcleo negro/violeta.

Marsland-Glees- Erickson (M-G-E).

Se realizó el protocolo descrito en el anexo 1.4f. Esta técnica permite la impregnación argéntica de los filamentos nerviosos (axones) para observar su arquitectura característica en tonos marrón.

Las laminillas, correspondientes a los cortes de nervio de cada una de las pruebas anteriormente mencionadas, se observaron al microscopio a una amplificación de 100X y 400X para verificar el proceso de descelularización y analizar el grado de conservación de los componentes de la MEC.

8.1.4 Análisis morfométrico y estadístico

Se tomaron 8 campos al azar de cada una de las laminillas (tanto del grupo de nervio control como de nervio descelularizado) y a continuación, de acuerdo con la prueba a la que pertenecían, se llevó a cabo el análisis:

H y E: Se realizó conteo de núcleos por campo.

K-B, PAS, M-G-E y M-TCM: Se llevó a cabo un análisis densitométrico a través del programa ImageJ (versión 1.50i para Mac). Cada una de las micrografías se transformó en un archivo tipo 8 bit (escala de grises) y para cada una de las pruebas, se modificó el umbral de detección y se establecieron valores estándar para medir las unidades de densidad correspondientes.

Los datos recopilados de cada análisis se llevaron al programa SPSS (IBM® SPSS® Statistics versión 20 para Mac). Para analizar la distribución de los datos, se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para muestras independientes ($p < 0.05$). Una vez que se estableció este parámetro, la comparación entre grupos (nervio control y nervio descelularizado) se realizó por una prueba de t para muestras independientes ligada al estadístico de Levene, si poseían una distribución normal; o por la prueba U de Mann-Whitney si la distribución correspondía a una no normal ($p < 0.05$). Los gráficos correspondientes se construyeron con el software GraphPad PRISM® versión 7.

8.2 Recelularización *in vitro* del AA

8.2.1 Procuración de tejido adiposo

Se obtuvo grasa subcutánea de la región abdominal del ovino. El tejido se colocó en un riñón quirúrgico, se rocío con etanol al 70% y enseguida se lavó con solución salina estéril en un tubo cónico de 50 mL (Corning®, 275 River St., Oneonta, NY 13820 USA). A continuación, se tomó el tejido y se llevó a un tubo cónico nuevo y estéril que

contenía buffer PBS 1X suplementado (anexo 2.2), el cual se transportó en hielo para su procesamiento en el laboratorio. La muestra de grasa provenía de un procedimiento externo a este estudio y fue proporcionada por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

8.2.2 Aislamiento y cultivo primario de CMM-TA

A la grasa se le realizaron 3 lavados con buffer PBS 1X, pH 7.4 estéril y 3 lavados más con PBS 1X suplementado para cultivo celular (anexo 2.3), todos éstos se llevaron a cabo en un tubo cónico de 50 mL y condiciones de esterilidad. Enseguida, el tejido se fragmentó hasta obtener pequeñas porciones (disgregación mecánica), esto se realizó sobre una placa de Petri (Corning®) con ayuda de tijeras y pinzas. A continuación, el tejido se colocó en un recipiente estéril que contenía un agitador magnético, se le adicionó un volumen de colagenasa I al 0.2% (anexo 2.4) y la mitad de este volumen de medio suplementado sólo con antibiótico y antimicótico, de tal manera que esta solución permitiera al tejido quedarse suspendido en la superficie; esto se colocó en agitación a 37°C de 2 a 2.5h hasta observar la disgregación del tejido en la solución. Posteriormente, (evitando los restos de tejido acumulados en la superficie) se recuperó la solución de tejido disgregado y se pasó a un tubo cónico de 50 mL. A estos tubos se les adicionó PBS 1X suplementado y enseguida fueron centrifugados a 5000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y el botón celular se lavó una vez más por centrifugación. Finalmente, el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio completo (anexo 2.5) y se sembró en una botella de cultivo de 25 cm² (Corning®), el volumen se ajustó a 5 mL y se incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Durante 3-5 días se monitoreó el cultivo y al observar células adherentes con morfología fibroblastoide, se le retiró el sobrenadante y se cambió por medio completo. El sobrenadante fue colocado en una botella de cultivo nueva de 25 cm² y se sometió a monitoreo para observar si algunas células se adherían a la botella. El medio se renovó cada 3 días hasta que las células alcanzaron un 80% de confluencia.

8.2.3 Expansión

A las botellas de cultivo primario con un 80% de confluencia se les retiró el medio y se les adicionó 1 mL de tripsina-EDTA 0.25% 1X (Gibco®), se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% por 5 min. Al cabo de este periodo se observaron al microscopio para corroborar el desprendimiento de las células. Una vez que estas se despegaron de la superficie de la botella, se pasaron a un tubo cónico de 15 mL y se les agregó 1 mL de medio completo para después centrifugar a 5000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio completo, a continuación fue dividido en 2 alícuotas y cada una de éstas se sembró en una botella de cultivo nueva completando el volumen a 5 mL con medio completo. Cada tres días se reemplazó el medio de cultivo por medio completo fresco y cuando la monocapa celular alcanzó un 80% de confluencia, se repitió este procedimiento (pase o subcultivo).

8.2.4 Caracterización de CMM-TA por ICQ

Conteo celular

A las botellas de cultivo del tercer pase con un 80% de confluencia se les retiró el medio y se les adicionó 1 mL de tripsina-EDTA 0.25% 1X, se incubaron a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5% por 5 min. Al cabo de este periodo se observaron al microscopio para corroborar el desprendimiento de las células. Una vez que estas se despegaron de la superficie de la botella, se pasaron a un tubo cónico de 15 mL y se les agregó 1 mL de medio completo para después centrifugar a 5000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio completo. Se tomaron 4 µL de la suspensión celular, se colocaron en un tubo para microcentrifuga de 0.2 mL (Corning®), se adicionaron 16 µL de una solución de colorante azul tripano al 2 % (anexo 2.6) y se mezclaron por pipeteo. De esta solución de células y colorante se tomaron 10 µL y se cargaron en una cámara de Neubauer. La cámara se llevó al microscopio, se enfocó con el objetivo de 10X y se realizó el conteo.

A continuación, se calculó el promedio de células de los cuadrantes y se aplicó la siguiente fórmula:

$$(\bar{x} \text{ células})(FD)(FD \text{ de la cámara}) = \frac{\text{células}}{mL}$$

$$(\bar{x} \text{ células})(5)(1 \times 10^4) = \frac{\text{células}}{mL}$$

Fijación

Posterior al conteo, se realizaron los cálculos pertinentes para sembrar 7×10^4 células en cada uno de los 4 pozos de una microcámara de cultivo sobre portaobjetos Nunc™ 177399 Lab-Tek® Chamber Slide™ (Thermo Scientific Nunc®). Adicionalmente, a cada uno de los pozos se le agregaron 500 µL de medio completo y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% hasta alcanzar un 60-80% de confluencia. A continuación, se retiró el medio de cultivo de cada uno de los pozos de la microcámara y se realizó un lavado con buffer PBS 1X, pH 7.4, se retiró y enseguida las células se fijaron con 500 µL de metanol-acetona (1:1) por 20 min a 4°C. Tras este periodo se retiró el fijador y se realizó un lavado con buffer PBS 1X, pH 7.4, se retiró y se dejó secar, para posteriormente almacenar a 4°C hasta su uso.

ICQ

Una vez que se fijaron las células al portaobjetos de la microcámara de cultivo se procedió a realizar la caracterización de CMM-TA con los anticuerpos primarios CD-90 (USBiological: 100 µg c2441-60, monoclonal de cabra) y CD-105 (USBiological: 200 µg c2446-55, monoclonal de ratón), marcadores de selección positiva y el sistema de detección “Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB” (ab64264) (Abcam®, Cambridge, Reino Unido).

Día 1: Se lavó en Tris – Buffer Salino + Tween 20 1X (TBST) (anexo 3.1) por 3 min. A continuación, se realizó una inmersión en solución recuperadora de antígenos 1X (por sus siglas en inglés TRS, Target Retrieval Solution) (Dako®) a 100°C por 20 min (previo a esto la solución se precalentó por 20 min a la misma temperatura) y se dejó

enfriar a TA por 20 min. Enseguida se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3%, durante 10 min a TA y se lavó con TBST 1X por 3 min. Después se llevó a cabo el bloqueo de proteínas endógenas a 37°C durante 30 min y se agregó el anticuerpo primario, se incubó toda la noche a 4°C.

Día 2: Se lavó 2 veces en TBST 1X y se adicionó el anticuerpo secundario, se incubó a 37°C por 30 min. Se lavó 2 veces con TBST 1X y se agregó la solución de estreptavidina-HRP, se incubó a 37°C por 30 min. Se lavó con TBST 1X y se reveló con el cromógeno 3-3' diaminobenzidina (DAB) durante 10 min.

A continuación, se realizó una contratinción en la cual se lavó el exceso con agua corriente, se tiñó con Hematoxilina de Harris por 2 min, se lavó hasta que el colorante dejó de teñir el agua, se deshidrató gradualmente en alcoholes de diferentes concentraciones (70, 80, 96, 96, 100 y 100%), se aclaró en xilol y se montó con resina Entellan (anexo 1.3).

Análisis morfométrico

De las laminillas correspondientes a cada uno de los marcadores de identidad, se tomaron fotografías de ocho campos al azar. El porcentaje de positividad se calculó contando el número de células totales y el número de células con marcaje positivo para aplicar la siguiente fórmula:

$$\% \text{ positividad} = \frac{\# \text{ células con marcaje positivo}}{\# \text{ células totales}} \times 100$$

8.2.5 Diferenciación de CMM-TA a CtS

La diferenciación se realizó a partir de células del tercer o cuarto pase. Una botella de cultivo de CMM-TA con una confluencia de 60% se lavó con buffer PBS 1X, pH 7.4 y se le adicionó medio mínimo esencial MEM alpha (1X) + GlutaMAX™ -I (Gibco®) suplementado con Gentamicina a 50µg/mL, Fungizone® a 2.5 µg/mL y β-Mercaptoetanol 1mM (SIGMA-ALDRICH®). A las 24 h, se cambió el medio por medio completo adicionado con ácido transretinoico (ATRA) 0.1mM (Calbiochem®, ©MerkKGaA, Darmstadt, Alemania), este se dejó por 72 h. Finalmente, a las células se les agregó medio completo suplementado con forskolina 5mM (Calbiochem®), factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante-β (βFGF) 10ng/mL (PEPROTECH, INC., Rocky Hill. NJ, USA), factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas recombinante-AA (PDGF-AA) 10 ng/mL (PEPROTECH, INC.) y 1β-herregulina humana recombinante 200 ng/mL (PEPROTECH, INC.). Este último medio se conservó de 2 a 8 días, renovándose al menos cada tercer día.

8.2.6 Caracterización de CtS por ICQ

La caracterización se llevó a cabo siguiendo los pasos del punto 8.2.4, usando como marcador de selección positiva el anticuerpo primario S-100 (Abcam®: ab7852, monoclonal de ratón).

8.2.7 Recelularización *in vitro*

Se tomaron los andamios acelulares previamente preparados, contenidos en buffer PBS 1X, pH 7.4 a 4°C y, en condiciones de esterilidad, se les retiró la solución tampón con ayuda de una pipeta pasteur. Se realizó un lavado rápido en etanol (inmersión) y se lavó en 2 cambios de buffer PBS 1X suplementado. A continuación, de una botella de cultivo de CtS confluyente del tercer pase, se procedió a realizar el conteo celular tal como se especifica en el apartado 8.2.4 y se realizaron los cálculos pertinentes para preparar alícuotas de 3×10^5 células en 50 µL de medio, que fueron cargadas en jeringas de insulina. Delicadamente y con ayuda de pinzas, se inyectó la suspensión

celular en cada uno de los andamios acelulares, se colocaron en una caja de petri (Corning® 430166 Sterile 60 x 15mm) y se cubrieron con un volumen de medio fresco completo para ser incubados por 48 h en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C.

Para evidenciar este procedimiento se tomó uno de los andamios recelularizados, se fijó y procesó, como se indica en el apartado 8.1.3, para realizarle una tinción de H y E.

8.3 Injerto en el modelo animal

8.3.1 Características y criterios de la población

Se incluyeron 12 hembras del mamífero *Ovis aries* de aproximadamente 6 meses de edad, con un peso de 20-30 kg, esqueléticamente maduros y clínicamente sanos. Cualquier ejemplar que no presentó las características de sexo, edad y peso establecidos, así como cualquier alteración en la marcha previo a la cirugía se excluyó del estudio. Como criterio de eliminación se tomó la presencia de infecciones en la zona quirúrgica o complicaciones post-quirúrgicas graves.

Los modelos animales de experimentación se mantuvieron en estabulación con disposición de alimento y agua *ad libitum*, cumpliendo con las disposiciones que dicta la NOM-062-ZOO-1999, a través del servicio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

Para el estudio, la población se dividió en 2 grupos experimentales, con 6 ejemplares cada uno: A y XR.

8.3.2 Procedimiento quirúrgico

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron llevados a cabo por el mismo cirujano. Los animales fueron colocados en una mesa quirúrgica y se sedaron por vía intravenosa con ketamina (10 mg/kg) y xilacina (0.5 mg/kg), se procedió a realizar la tricotomía de la región que va desde el trocánter mayor izquierdo hasta la parte inferior antes del comienzo de la pezuña. Enseguida, se intubó al animal y mediante un vaporizador se administró isoflurano 2-3% para dar el mantenimiento anestésico. Enseguida, se realizó la asepsia y antisepsia con un cepillo de lavado quirúrgico impregnado con un 3% chloroxlenol (PCMX) (BD E-Z Scrub™ 116) y se llevó a cabo la técnica quirúrgica estéril. Se realizó una incisión de aproximadamente 9 cm en la región glútea lateral de la extremidad posterior izquierda del ovino. Después de disecar el tejido subcutáneo se procedió a la identificación de los músculos glúteos e isquiotibiales, para proceder a su disección roma y exponer el nervio ciático en el trayecto correspondiente al tamaño de la incisión. Enseguida, de acuerdo con el grupo experimental en cuestión, se procedió de la siguiente manera:

Grupo 1. A

Usando un castro viejo, se realizó la escisión de un segmento de nervio ciático de 20 mm de longitud y se giró 180° para suturar microquirúrgicamente el cabo proximal del injerto al cabo distal del nervio del ovino y viceversa. El segmento de nervio es girado para romper el patrón de fascículos e imitar la acción de un autoinjerto en la clínica.

Grupo 2. XR

Posterior a la excisión del segmento nervioso, en su lugar, se procedió a injertar el andamio recelularizado.

En ambos casos se empleó sutura de calibre 9.0. Al finalizar la neurorrafia se procedió a suturar el sitio quirúrgico y al culminar la intervención los ovinos fueron sometidos a tratamiento postquirúrgico: vigilancia estrecha durante su período de recuperación anestésica, manejo del dolor y administración de antibiótico con ingesta de agua y alimento *ad libitum*.

8.4 Evaluación de la recuperación funcional y determinación del grado de regeneración nerviosa

8.4.1 Evaluación visual

Se evaluó la recuperación del movimiento en la extremidad intervenida, la marcha y coordinación de las extremidades posteriores, a través de su documentación con evidencias fotográficas y de video. Las evidencias se recabaron una vez por mes durante un periodo de 6-7 meses.

8.4.2 Evaluación neurofisiológica *in vivo*

Un día previo al sacrificio, a todos los animales se les realizó tricotomía de la región posterior del muslo de ambas extremidades posteriores y se dejaron en ayuno. Bajo la misma técnica anestésico-quirúrgica se expuso el nervio ciático; enseguida se colocó un electrodo activo en la porción posterior del músculo bíceps femoral y a 3 cm de este uno de referencia, el electrodo de tierra física se colocó en la prominencia ósea de la tibia. A continuación, se llevó a cabo la estimulación del tronco del nervio mediante una aguja monopolar antes de la anastomosis proximal (pre-lesión) y después de la distal (post-lesión), siempre colocando una referencia al electrodo a 3cm. El potencial eléctrico del estímulo fue de 34V, el cual corresponde a un estímulo supramáximo, es decir que estimula a todas las fibras nerviosas. Se identificó el registro electromiográfico sobre el músculo, cuantificando la amplitud de la respuesta; la latencia, como tiempo entre la aplicación del estímulo y observación de la respuesta eléctrica, y se calculó la velocidad de conducción nerviosa (VC) como: distancia entre estímulo pre-lesión y post-lesión / latencia pre-lesión - latencia post-lesión.

Aunado a lo anterior, se valoró la respuesta del músculo gastrocnemio lateral, se llevó a cabo el mismo procedimiento, con la variante de colocación del electrodo activo: en el plano axial se trazó una línea entre el borde posterior del músculo y el platillo tibial (vientre muscular), colocándose el electrodo en el punto medio y su referencia a 3 cm. Este procedimiento se llevó a cabo en ambas extremidades posteriores de todos los animales, ya que las mediciones control se obtuvieron de la extremidad contralateral no

intervenida. El registro de los datos se realizó con un instrumento de electrodiagnóstico con un Nicolet Viking (Nicolet Instrument Corp.). Los datos digitales se almacenaron en el ordenador y las evaluaciones electrofisiológicas fueron realizadas por un experto que fue cegado a la asignación de grupo.

En la Figura 9 se muestra un ejemplo de la disposición de los electrodos durante una prueba neurofisiológica en bíceps femoral, así como el equipo empleado durante esta técnica.



Figura 9. **Disposición de los electrodos en las pruebas neurofisiológicas y equipo de trabajo**

En la fotografía del lado izquierdo, se muestra la disposición de los electrodos durante el registro electromiográfico en el bíceps femoral. En naranja se señala al electrodo activo o cátodo, que registra la actividad en el músculo, y su respectiva referencia. En azul se muestra al estimulador monopolar, encargado de brindar el estímulo en el tronco del nervio, y su referencia. Finalmente en blanco se indica la posición del electrodo de tierra física. Del lado derecho, se observa el amplificador y el sistema de registro empleados durante las pruebas neurofisiológicas.

Análisis estadístico

Los datos recopilados se llevaron al programa SPSS. La distribución de los datos, se analizó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$). Una vez que se estableció este parámetro, la comparación entre grupos se realizó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) acoplado a la prueba post-hoc de Scheffé para comparaciones múltiples, puesto que todas las variables analizadas poseían una distribución normal pero un número de muestra (n) diferente ($p < 0.05$). Los gráficos correspondientes se construyeron con el software GraphPad PRISM® versión 7.

8.4.3 Eutanasia y recolección de piezas

Al concluir la evaluación neurofisiológica, todos los animales se sometieron a eutanasia química con pentobarbital sódico (90-210 mg/kg/IV). Una vez que se comprobó que los animales se encontraban sin vida, se procedió a la disección de los músculos bíceps femoral y gastrocnemio, de ambas extremidades posteriores. A la par, se llevó a cabo la escisión del nervio ciático; en la extremidad intervenida, ésta se realizó disecando al menos a 1 cm de distancia de las suturas proximal y distal.

8.4.4 Procesamiento de las piezas

8.4.4.1 Músculos

Posterior a su disección, las piezas musculares fueron analizadas macroscópicamente, pesadas y se calculó la relación de peso húmedo:

$$\% \text{ peso húmedo} = \frac{(\text{peso húmedo}_{\text{extremidad intervenida}})(\text{peso húmedo}_{\text{extremidad contralateral}})}{100}$$

Análisis estadístico

Los datos recopilados se llevaron al programa SPSS (IBM® SPSS® Statistics versión 20 para Mac). Para analizar la distribución de los datos, se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para muestras independientes ($p < 0.05$). Una vez que se estableció este parámetro, la comparación entre grupos (A y XR) se realizó por una prueba de t para muestras independientes, si poseían una distribución normal; o por la prueba U de Mann-Whitney si la distribución correspondía a una no normal ($p < 0.05$). Los gráficos correspondientes se construyeron con el software GraphPad PRISM® versión 7.

8.4.4.2 Segmentos de nervio

Ipso facto a la disección, las piezas se marcaron en el extremo proximal con un punto de sutura y/o una marca de tinta china, se fijaron (anexo 1.1.I) y se procesaron mediante la técnica histológica convencional (anexo 1.1). En la figura 10 se esquematiza como se llevó a cabo el muestreo de los injertos.

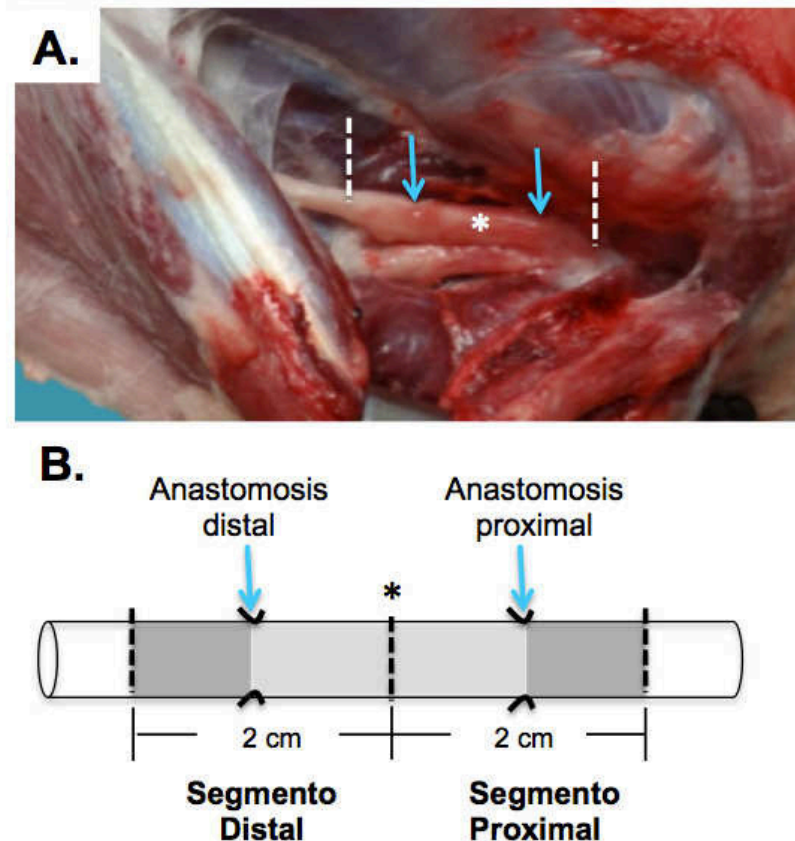


Figura 10. Muestreo del injerto en nervio ciático

A. Vista macroscópica del injerto, previo a su escisión, en un defecto de 20 mm en nervio ciático de ovino. Las flechas azules indican la anastomosis proximal (derecha) y distal (izquierda), la línea blanca punteada señala el sitio de corte para la toma de muestra, y el * indica la región donde se encuentra el injerto. **B.** Diagrama esquemático que muestra dos sitios: segmento distal y proximal de una muestra de nervio de la extremidad intervenida. Las líneas negras punteadas indican la sección en la que se llevó a cabo el corte para generar las piezas que se sometieron a la evaluación morfológica.

8.4.5 Análisis morfológico

Tinciones histológicas e histoquímicas

Posterior a su procesamiento, los segmentos de nervio fueron sometidos a las mismas pruebas morfológicas citadas en la sección 8.1.3. Las diversas tinciones histológicas e histoquímicas se emplearon para evaluar la regeneración a nivel axonal, recelularización e integridad de la MEC.

Inmunohistoquímicas

Se utilizaron cortes de 3µm en laminillas previamente silanizadas (anexo 3.2). Éstas se desparafinaron e hidrataron (anexo 1.2). A continuación se siguió el procedimiento previamente descrito en la sección 8.2.4.

Como anticuerpos primarios se emplearon S-100 y neurofilamentos (Leica Biosystems, Benton Line, Reino Unido: NCL-L- NF200-N52, monoclonal de ratón).

8.4.6 Análisis morfométrico y estadístico

Tinciones histológicas e histoquímicas

Para todas las pruebas, excepto H y E, se tomaron 8 campos al azar de cada una de las laminillas (del grupo A, XR y control) y se llevó a cabo un análisis densitométrico a través del programa ImageJ (versión 1.50i para Mac). Cada una de las micrografías se transformó en un archivo tipo 8 bit (escala de grises) y, para cada una de las pruebas, se modificó el umbral de detección y se establecieron valores estándar para medir las unidades de densidad correspondientes. Los datos recopilados de cada análisis se llevaron al programa SPSS (IBM® SPSS® Statistics versión 20 para Mac). Para analizar la distribución de los datos, se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para muestras independientes. Una vez que se estableció este parámetro, la comparación entre grupos se realizó por un ANOVA acoplado a la prueba post-hoc de Scheffé para comparaciones múltiples, si poseían una distribución normal; o por la prueba de Kruskal-Wallis y post-hoc U de Mann-Whitney con arreglo de Bonferroni si la

distribución correspondía a una no normal. Los gráficos correspondientes se construyeron con el software GraphPad PRISM® versión 7.

CAPÍTULO IX. RESULTADOS

9.1 Preparación del andamio: análisis morfológico

9.1.1 Índice de descelularización.

Núcleos y restos celulares

El éxito del proceso de descelularización fue evaluado a través de una tinción de H y E (Figura 11) en la cual se compararon los hallazgos morfológicos entre un corte de nervio procesado (descelularizado) y uno no procesado (control). En el nervio control se observaron pequeñas estructuras redondas y alargadas de color violeta, que corresponden a los núcleos de los diversos tipos celulares que se encuentran formando la arquitectura del nervio periférico; diferenciándose de su citoplasma en tono rosado. En el nervio descelularizado no se observaron núcleos ni restos celulares, respecto al control.

Los tincione histológica TCM e histoquímicas de K-B y PAS confirmaron la ausencia de núcleos (Figura 11).

Estado de la vaina de mielina

El estatus de la vaina de mielina de las CS se analizó mediante la histoquímica de K-B (Figura 11). En el control, se observaron núcleos celulares y en azul intenso los lípidos positivos de la vaina de mielina, mostrando la morfología típica del nervio periférico (zigzag); mientras que en el nervio descelularizado no se apreciaron núcleos remanentes y sólo se observaron escasas líneas azules muy tenues, discontinuas y desorganizadas.

Integridad axonal

Mediante la impregnación argéntica de M-G-E (Figura 11) fue posible observar a los axones del nervio control en un color marrón oscuro, en su estructura se apreció organización y continuidad, tanto en su longitud como calibre, presentando además el arreglo típico del nervio periférico. En contraste, el nervio descelularizado evidenció una menor cantidad de axones por superficie, en tonos más claros, su estructura se apreció desorganizada y se notó la pérdida de uniformidad y continuidad.

9.1.2 Conservación de la MEC.

Preservación de las fibras de colágeno

La tinción de TCM (Figura 11) permitió visualizar en color azul a las fibras de colágeno, uno de los principales componentes de la MEC; los núcleos en violeta y el citoplasma en tonos de rosado a rojo. En contraste con el control, en el nervio descelularizado sólo se observaron líneas azules, continuas y organizadas que conservan la estructura de la MEC; no hubo presencia de núcleos y no se observaron remanentes de citoplasma.

Aunado a lo anterior, se llevó a cabo una modificación de esta tinción (Figura 11) para corroborar lo observado. En ambas preparaciones se observaron líneas azules organizadas que conservaban la estructura típica de la MEC. Además, en el control se observaron estructuras en color marrón que correspondían a los núcleos celulares; mientras que en el descelularizado no se observaron.

LE

La histoquímica de PAS (Figura 11) brindó la posibilidad de identificar a la LE a través de la detección de sus hidratos de carbono positivos en tonos magenta. En el nervio control, estos polisacáridos complejos se observaron de manera organizada rodeando a las fibras nerviosas. Cabe destacar que el proceso de descelularización no causó alteraciones de la LE en el nervio tratado.

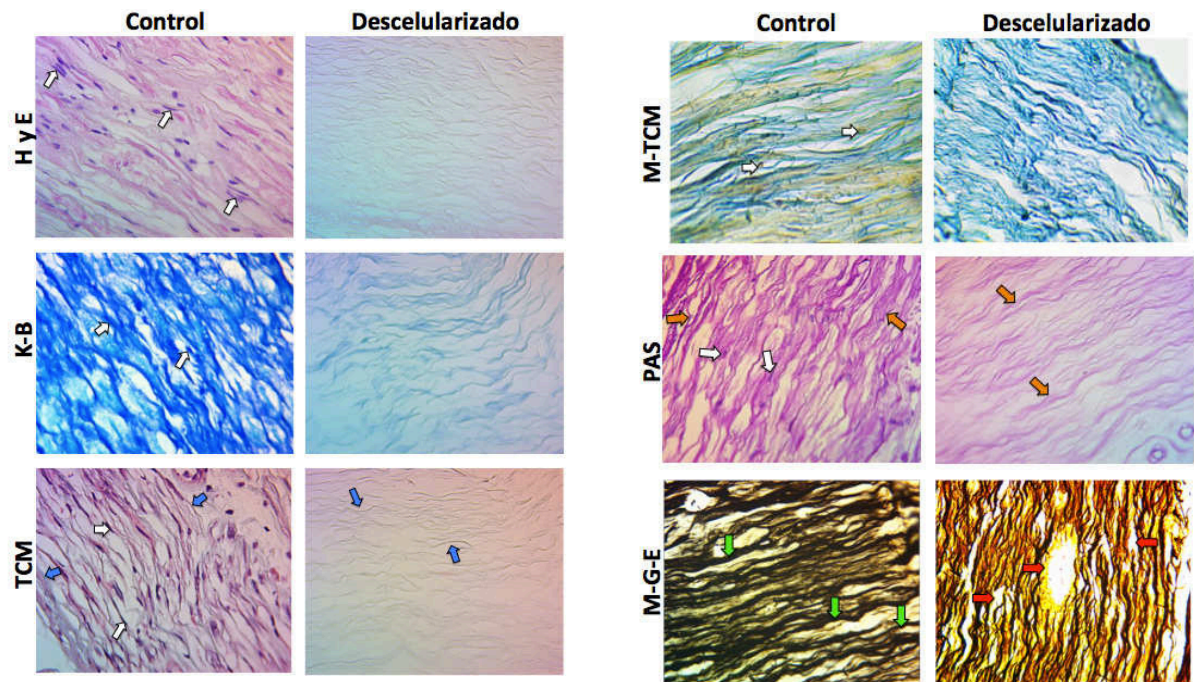


Figura 11. **Análisis morfológico del AA.**

A través de 6 técnicas se evaluó el índice de descellularización y la conservación de la MEC en el AA. En el control, se observa la presencia de núcleos (flechas blancas) e integridad de la MEC [colágeno (flechas azules), LE (flechas naranjas)] y axones (flechas verdes) en las muestras control. En contraste, los nervios tratados (descelularizados) no muestran núcleos o remanentes del citoplasma, se observa interrupción en los axones (flechas rojas) y destaca la integridad de la MEC, con la excepción de leves alteraciones en las fibras de colágeno (flechas amarillas). Fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio humano, amplificadas a 400X.

9.2 Preparación del andamio: análisis morfométrico y estadístico

9.2.1 Índice de descellularización.

Tras la evaluación cuantitativa de los cortes teñidos con H y E, mediante un análisis de conteo por campos, se encontró que la diferencia entre la cantidad de componente nuclear cuantificado en el nervio descelularizado en comparación con el grupo control es estadísticamente significativa, siendo menor en el nervio tratado (figura 12).

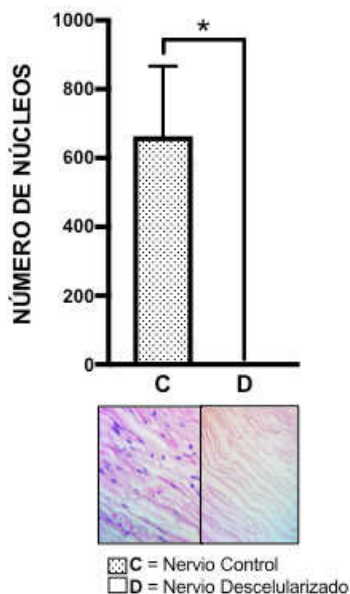


Figura 12. **Análisis de la presencia de componentes nucleares en los grupos de estudio.** La cantidad de componentes nucleares cuantificados en el nervio descelularizado, es significativamente menor en comparación con el grupo control (nervio no procesado). Debajo del eje de los grupos de estudio, se observan fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio humano amplificadas a 400X teñidas con H y E. Los datos se presentan como media \pm DS (n=5; prueba de U Mann-Whitney). *p < 0.05.

9.2.2 Análisis densitométrico

Mielina

Como resultado de la comparación entre el grupo control y el descelularizado, se observó una diferencia estadísticamente significativa respecto a la cantidad de mielina cuantificada. En el nervio descelularizado se encontró cerca de tres veces menor cantidad de mielina respecto al control (figura 13).

Axones

Tras la evaluación morfométrica de la impregnación argéntica de M-G-E, se encontró una diferencia estadísticamente significativa, en la cual la densidad axonal en el nervio descelularizado es aproximadamente 4 veces menor respecto al control (figura 13).

MEC: polisacáridos complejos de la LE

En la evaluación morfométrica, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la cantidad de polisacáridos complejos positivos cuantificados entre el grupo control y de estudio (descelularizado) (figura 13).

MEC: fibras de colágeno

La proporción de fibras de colágeno cuantificadas, mediante la tinción de modificada de Masson, no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al control (figura 13).

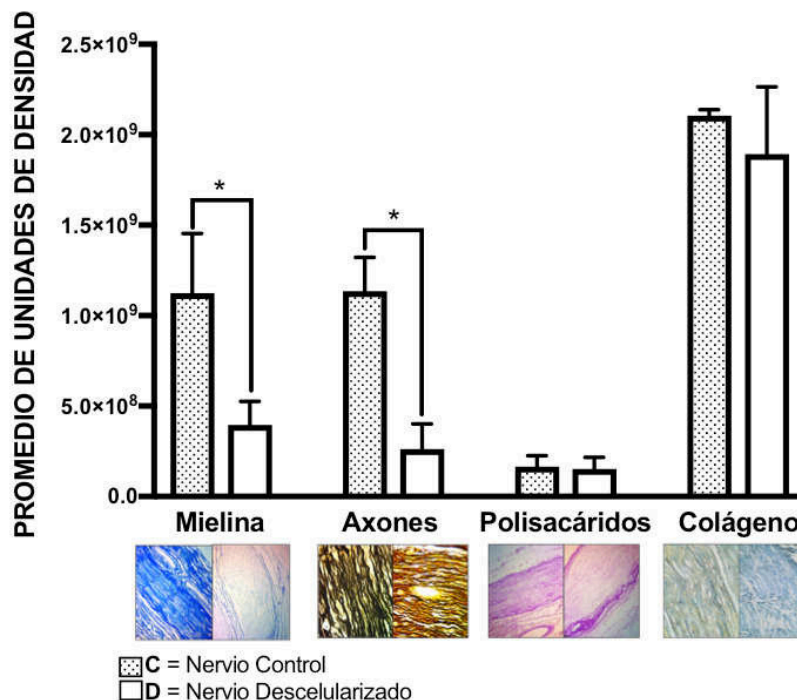


Figura 13. Análisis densitométrico de mielina, axones, polisacáridos y colágeno en el nervio descelularizado comparado con el nervio control.

Se llevó a cabo la evaluación morfométrica de mielina, axones, polisacáridos complejos de la LE y colágeno en los grupos experimentales. Al cabo de ésta, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación de mielina y axones; en ambos casos, el nervio control presentó una cantidad superior del componente. Respecto a los polisacáridos complejos y el colágeno, no se encontraron diferencias entre los grupos. Debajo del eje de las X, se observan fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio humano teñidas con K-B (100x), M-G-E (400X), PAS(100X) y M-TCM (100x). Los datos se presentan como media \pm DS [n=5; prueba de U Mann-Whitney (mielina, axones) y prueba de t para muestras independientes ligada al estadístico de Levene (polisacáridos y colágeno)]. *p <0.05.

9.3 Recelularización *in vitro* del AA

9.3.1 Caracterización y diferenciación celular

Las CMM-TA se caracterizaron por ICQ mediante los marcadores de selección positiva CD90 y CD105, tras inducir la diferenciación a CtS se empleó el marcador S-100 para comprobar el éxito del proceso.

A continuación, en la tabla 2 se muestran las condiciones que se establecieron para las inmunotinciones tras el proceso de estandarización: tipo de tejido ovino empleado como control para establecer el marcaje, tipo celular esperado en el marcaje positivo y concentraciones finales empleadas en cada una de las técnicas.

Tabla 2. **Condiciones estandarizadas para las inmunotinciones**

Anticuerpo	Tejido control	Marcaje +	Concentración
Anti CD90	cerebro	neuronas	1:100
Anti CD105	bazo	endotelio	1:25
Anti S-100	cerebro	oligodendrocitos	1:1500

El marcaje positivo para la técnica, se observó a través de un precipitado color marrón que se diferencia de los núcleos en color violeta (figura 14). Para el anticuerpo CD90 se observó marcaje positivo en un 88.36% de las células, mientras que para el CD105 el porcentaje fue de 77.30%. Después del proceso de diferenciación, se observó una positividad del 66.56% para el marcador S-100. En todos los casos se utilizó un control positivo de la técnica.

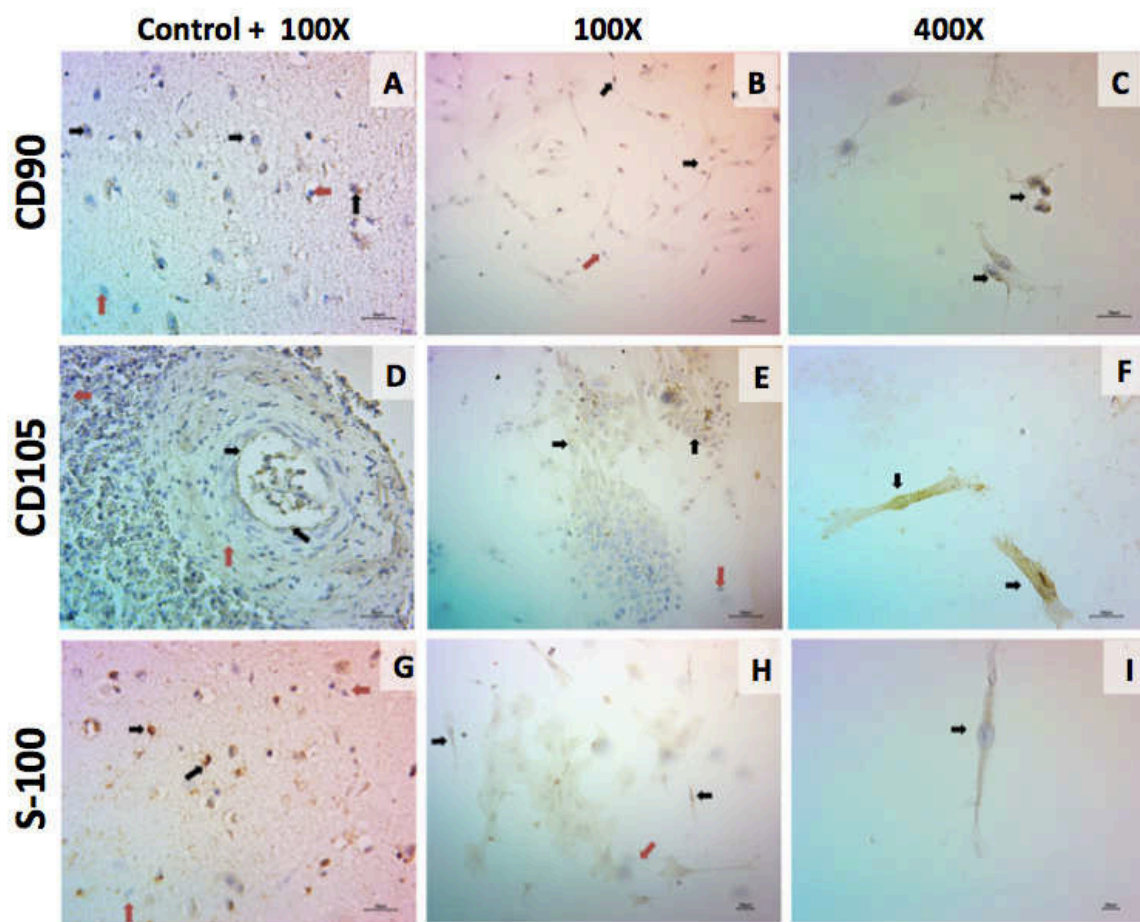


Figura 14. **Caracterización celular de las CtS**

En la figura se observan los resultados de la caracterización para las CMM-TA con los marcadores CD90 y CD105 y para las células diferenciadas a CtS con el marcador S-100. **A.** Corte de cerebro ovino con marcaje positivo para neuronas, **B-C.** y **E-F.** CMM-TA, **D.** Corte de bazo ovino con marcaje positivo para endotelio, **G.** Corte de cerebro ovino con marcaje positivo para oligodendrocitos, **H-I.** CtS. Flechas rojas: marcaje negativo, flechas negras: marcaje positivo. Fotomicrografías de inmunotinciones observadas a 100 y 400X.

9.3.2 Recelularización *in vitro*

La recelularización del AA se evidenció a través de una tinción de H y E, en la cual se pueden apreciar en tonos de magenta a violeta los núcleos correspondientes a las CtS trasplantadas (figura 15).

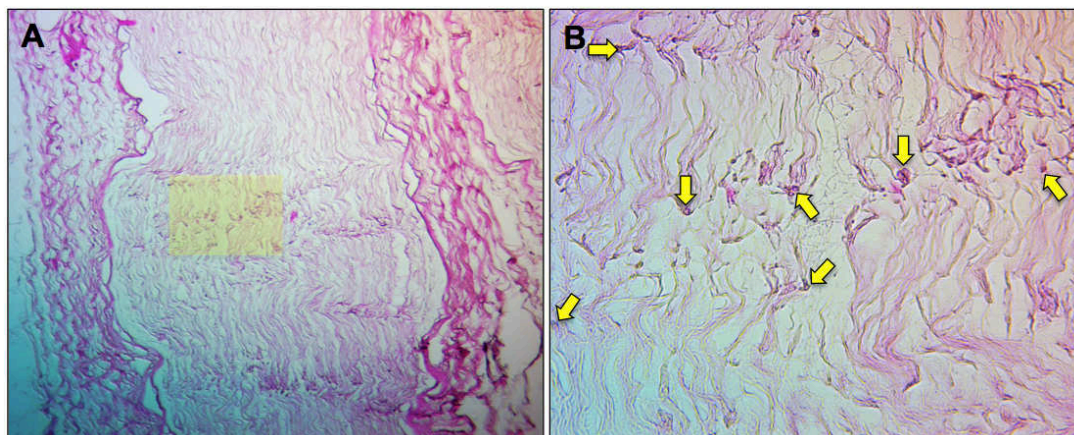


Figura 15. **Recelularización del AA de nervio humano con CtS.**

A. Se muestra un segmento del AA recelularizado y en color amarillo se indica la sección que se amplificó para obtener la figura 1.B. **B.** Se observa la presencia de núcleos (flechas amarillas), correspondientes a las CtS inyectadas en el AA. Fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio humano teñidas con H y E, amplificadas a 100 y 400X respectivamente.

9.4 Injerto en el modelo animal

9.4.1 Procedimiento quirúrgico

El procedimiento quirúrgico estéril se llevó a cabo en los todos los animales. En las figuras 16 y 17 se ilustra la técnica que fue realizada para el grupo de A (n=6) y XR (n=6), respectivamente.

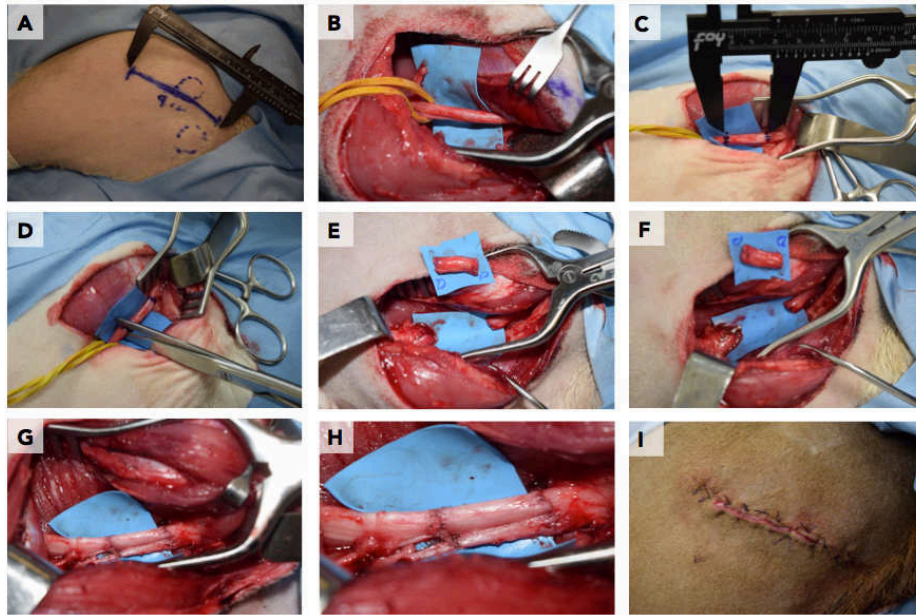


Figura 16. **Procedimiento quirúrgico para el grupo experimental de A.**
A. Zona quirúrgica, **B.** Disección del nervio ciático, **C.** Delimitación de la longitud (20 mm) para el autoinjerto en nervio ciático, **D.** Incisión para crear el defecto en el nervio ciático, **E-F.** Defecto nervioso y autoinjerto, **G** y **H.** Neurorrafia del Autoinjerto en nervio ciático del modelo ovino y **I.** Sitio quirúrgico suturado.

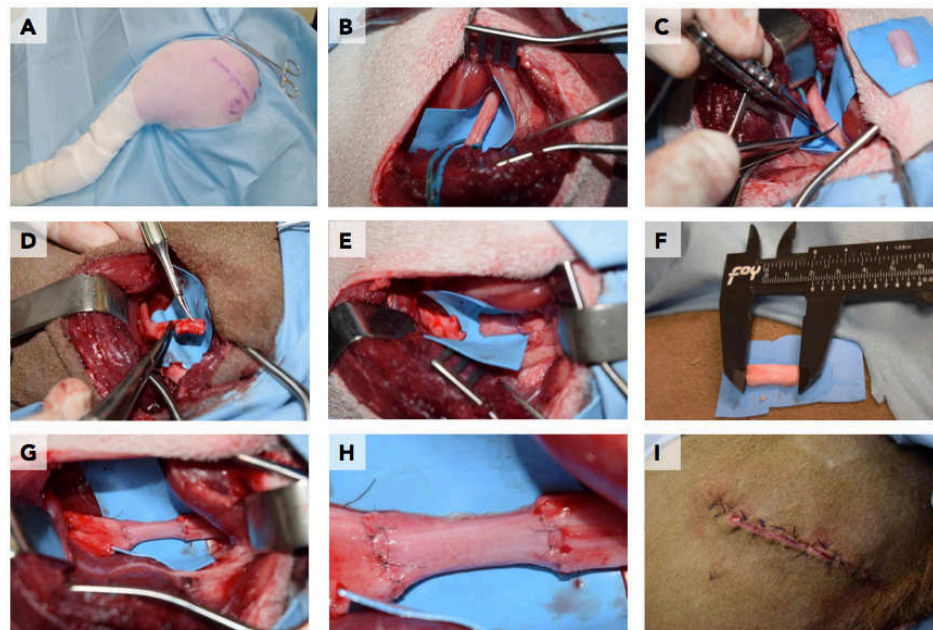


Figura 17. **Procedimiento quirúrgico para el grupo experimental de XR.**
A. Zona quirúrgica, **B.** Disección del nervio ciático, **Cy D** Incisión proximal y distal para crear el defecto en el nervio ciático, **E.** Defecto nervioso, **F.** AA de nervio humano recelularizado con CtS, **G** y **H** Neurorrafia del xenoinjerto en nervio ciático del modelo ovino e **I** sitio quirúrgico suturado.

9.4.2 Incidentes post-quirúrgicos

24 días posteriores a la intervención quirúrgica, un ejemplar del grupo A falleció a causa de complicaciones postquirúrgicas. Además, al cabo de 2 meses, uno de los integrantes del grupo XR fue sacrificado a causa de una grave úlcera por presión en la extremidad posterior izquierda. Esta lesión fue causada por desgaste, producto del arrastre de la extremidad intervenida a causa de la inmovilidad post-quirúrgica. A razón de lo anterior, se colocó una férula de PVC para inmovilizar la extremidad posterior intervenida de todos los animales.

La n final del estudio fue de 10 modelos animales de experimentación, divididos en 2 grupos (A y XR) con 5 ejemplares cada uno.

9.5 Evaluación de la recuperación funcional y determinación del grado de regeneración nerviosa

9.5.1 Evaluación visual

En el transcurso de 6 meses se llevó a cabo la documentación respecto a la evolución de la marcha y coordinación de las extremidades posteriores.

En el post-quirúrgico, y hasta cerca de los 2 meses, no se observaron cambios significativos en la movilidad de la extremidad intervenida en ninguno de los grupos experimentales. Entre los 2 y 4 meses, en todos los animales, se observó una mejoría respecto a la movilidad en la región de la tibia y el peroné; sin embargo, presentaban cojera y continuaban con dificultad en la marcha, manifestada por una anomalía en la flexión plantar de la articulación metatarso-falángica. A lo largo de los últimos meses, no se observaron cambios respecto a la movilidad de la articulación metatarso-falángica en ninguno de los grupos y, sólo en la mitad de los integrantes de ambos grupos, se presentó una ligera mejoría en el movimiento del metatarso. Sin embargo, en todos los modelos experimentales, a los 6 meses, la extremidad intervenida paso de ser arrastrada a representar un punto de apoyo durante la marcha (figura 18).

A continuación, en la figura 19 se presentan fotogramas que demuestran la función locomotora de la extremidad posterior intervenida los 6 meses.

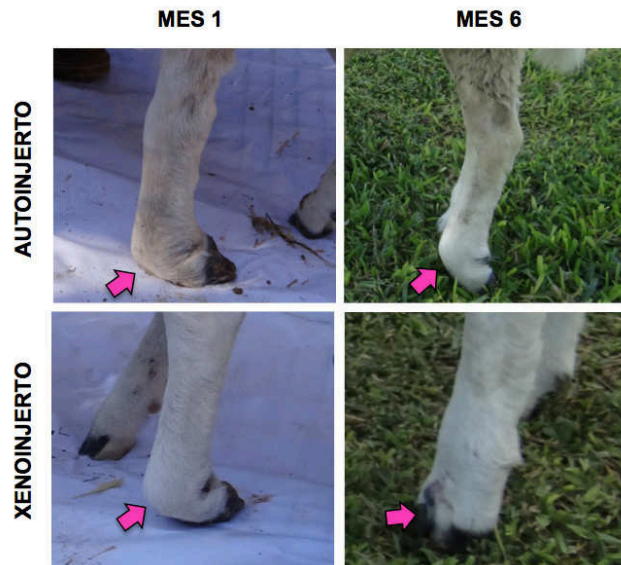


Figura 18. **Mejoría en la extremidad intervenida a los 6 meses post-quirúrgicos**
Se ilustra como el miembro inferior paso de ser arrastrado a representar un punto de apoyo para sostener el cuerpo y permitir el traslado de los modelos experimentales (flechas rosas).

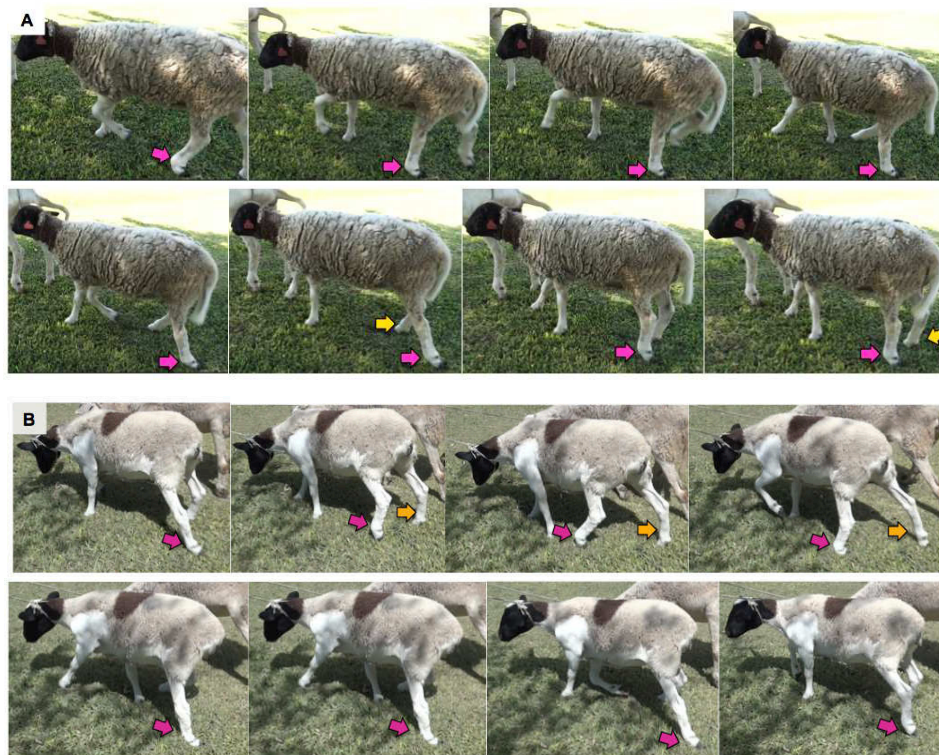


Figura 19. **Función locomotora a los 6 meses post-quirúrgicos**
A. A, B. XR. Se ilustra la función locomotora de la extremidad intervenida de cada uno de los grupos de estudio y, en ambos casos, es posible observar claudicación acompañada de una anomalía en la flexión plantar de la articulación metatarso-falángica (flechas rosas) en comparación con la extremidad control/ no intervenida (flechas amarillas).

9.5.2 Evaluación neurofisiológica *in vivo*

6 meses después de la cirugía, se logró registrar el potencial de acción compuesto en el bíceps femoral y gastrocnemio en respuesta a estímulos en la región proximal respecto a la anastomosis proximal del injerto.

Tras el análisis de los datos, se encontraron diferencias significativas entre la latencia registrada en el bíceps femoral de los grupos experimentales A y XR respecto al control; mientras que éstos no presentaron diferencias significativas entre sí. Respecto a la latencia en el gastrocnemio, se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos; el grupo XR presentó cerca de 3 veces mayor magnitud respecto al control y 2 ante el grupo A (figura 20).

En relación al pico de amplitud máxima, en ambos músculos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos intervenidos, sin embargo ambos presentaron diferencias significativas al compararlos con el control (figura 21).

En la VC, los resultados en bíceps femoral tanto como en gastrocnemio evidencian diferencias significativas entre el grupo XR y el control; sin embargo, XR y A, así como A y control no presentan diferencias entre sí (figura 22).

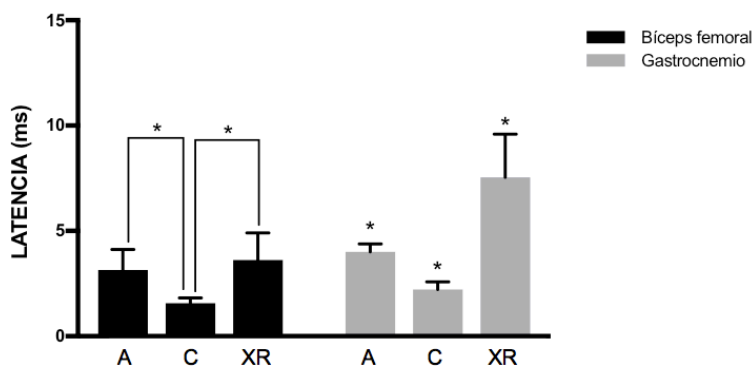


Figura 20. **Análisis de latencia a los 6 meses post-quirúrgicos**

En el bíceps femoral se observaron diferencias significativas entre los grupos A y XR respecto al control. En el caso del gastrocnemio se observaron diferencias significativas entre todos los grupos. **A**, Autoinjerto, **C**, Control y **XR**, Xenoinjerto Recelularizado. Los datos se presentan como media \pm DS (A y XR n=5, C n=10; ANOVA y post-hoc de Scheffé). *p <0.05.

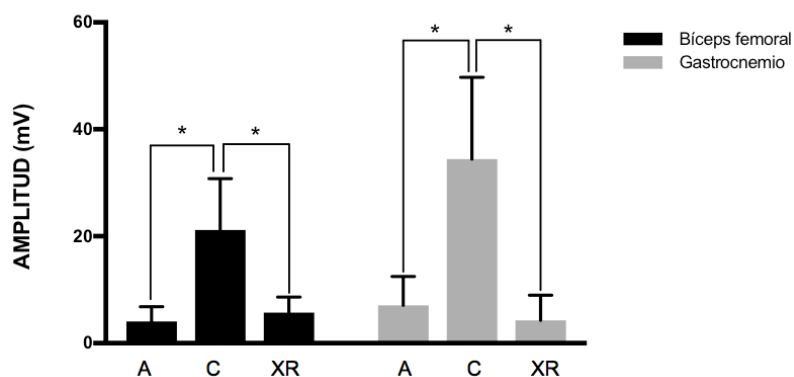


Figura 21. **Análisis del pico de amplitud máximo a los 6 meses post-quirúrgicos**

En ambos músculos, se observaron diferencias significativas entre los grupos A y XR respecto al control. **A**, Autoinjerto, **C**, Control y **XR**, Xenoinjerto Recelularizado. Los datos se presentan como media \pm DS (A y XR n=5, C n=10 ; ANOVA y post-hoc de Scheffé). *P <0.05.

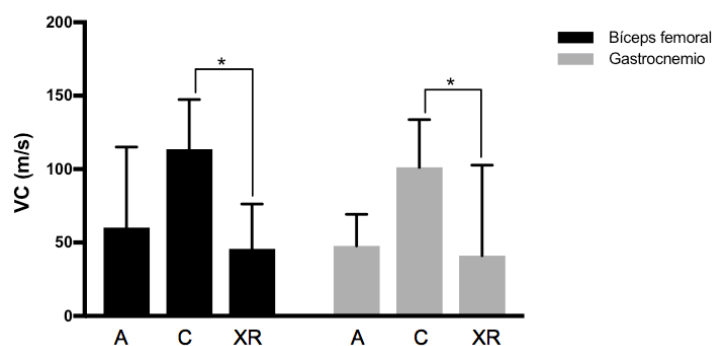


Figura 22. **Análisis de la VC a los 6 meses post-quirúrgicos**

En ambos músculos, se observaron diferencias significativas entre los grupos C y XR. **A**, Autoinjerto, **C**, Control y **XR**, Xenoinjerto Recelularizado. Los datos se presentan como media \pm DS (A y XR n=5, C n=10; ANOVA y post-hoc de Scheffé). *p <0.05.

9.5.3 Eutanasia, recolección y procesamiento de las piezas

9.5.3.1 Músculos

Tras el sacrificio, se recolectaron los músculos bíceps femoral y gastrocnemio de ambas extremidades de todos los animales, en la figura 23 se ilustra la disposición anatómica de las piezas musculares en el cadáver del ovino. No se observaron diferencias entre la morfología o elasticidad postoperatoria en el sitio quirúrgico, situado entre las prominencias óseas de la cabeza femoral y la tuberosidad isquiática.

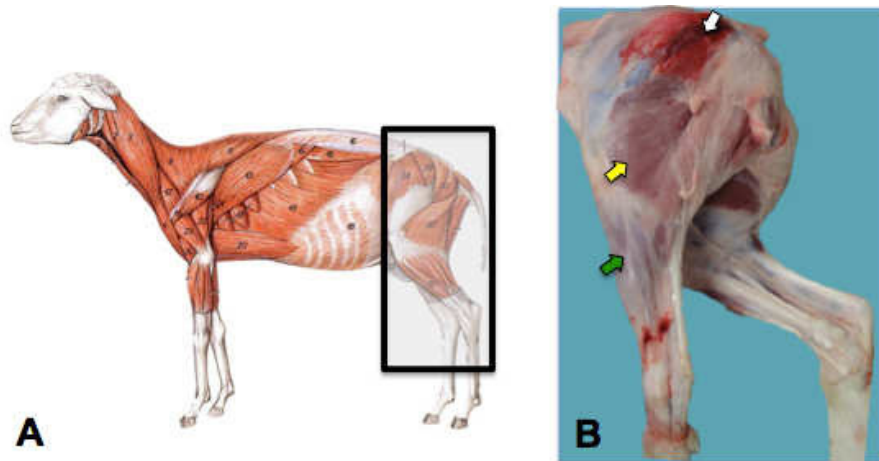


Figura 23. **Disposición anatómica de las piezas musculares en el cadáver**
A, Anatomía muscular del ovino, se indica la sección que se observa en la figura B **B**, Se muestra la localización de los músculos bíceps femoral (flecha amarilla) y gastrocnemio (flecha verde) en el cadáver del ovino, respecto al sitio quirúrgico (flecha blanca).

Bíceps femoral

Tras el examen físico, no se observaron cambios evidentes de tamaño entre los músculos de los grupos intervenidos y el control; sin embargo, en 2 de los integrantes del grupo A y en todos los de XR se observó una sección denervada del músculo, caracterizada por una decoloración localizada en la parte superior (figura 24). Respecto a la relación de peso húmedo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (figura 25).

Gastrocnemio

En ambos grupos experimentales, en la extremidad intervenida, el gastrocnemio presentó atrofia neurogénica, caracterizada por disminución en el tamaño del órgano y decoloración; ésta fue más marcada en el grupo XR (figura 24). El análisis estadístico fue consistente con los resultados observados, ya que se encontraron diferencias significativas entre el grupo A y XR, donde XR presentó un promedio en la relación de peso húmedo menor respecto a A.

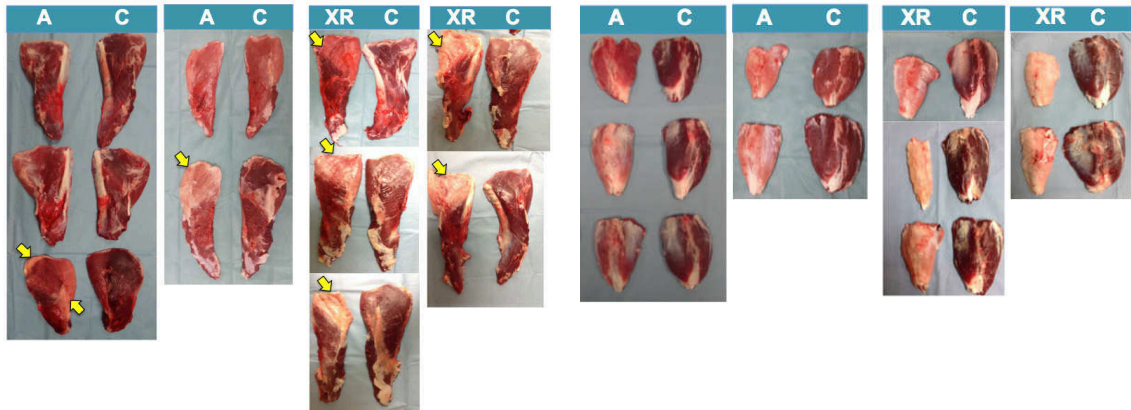


Figura 24. **Bíceps femoral y gastrocnemio**

A la izquierda, se contrastan los músculos bíceps femoral de ambos grupos experimentales vs. sus respectivos controles contralaterales. Con flechas amarillas se indica la zona visualmente denervada en el bíceps femoral. A la derecha, se observa el gastrocnemio de la extremidad intervenida vs el control contralateral. A simple vista, es evidente la disminución de tamaño de los grupos A y XR respecto a sus controles; además, estos mismos grupos presentan una notoria decoloración en toda la pieza muscular. **A**, Autoinjerto; **C**, Control contralateral y **XR**, Xenoinjerto Recelularizado.

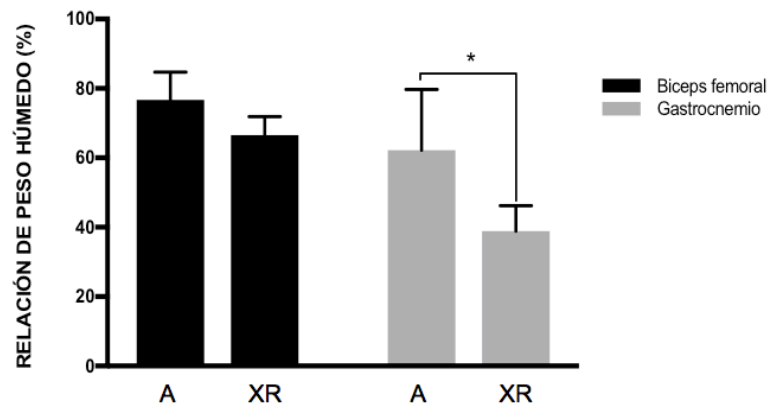


Figura 25. **Análisis cuantitativo de las piezas musculares**

No se encontraron diferencias significativas en la relación de peso húmedo entre ambos grupos experimentales en el bíceps femoral; mientras que respecto al gastrocnemio, se encontraron diferencias significativas entre A y XR. **A**, Autoinjerto y **XR**, Xenoinjerto Recelularizado. Los datos se presentan como media \pm DS (A y XR n=5, C n=10; ANOVA y post-hoc de Scheffé). *p < 0.05.

9.5.3.2 Segmentos de nervio

Tras la disección del nervio ciático, en la extremidad control se observó que los segmentos nerviosos mostraban una estructura lisa; mientras que en ambos grupos que recibieron injerto, se mostró engrosamiento del tejido nervioso.

9.5.4 Análisis morfológico

Tras el análisis microscópico de la región proximal y distal de los grupos A y XR, se observó que ambos presentaban dos zonas estructuralmente distintas: 1) una zona organizada, en donde la arquitectura del nervio periférico se conformaba por fascículos individualizados y envueltos por tejido conectivo, consistente con el arreglo típico del nervio periférico observado en el control. 2) Zonas desorganizadas que presentaron una disposición anárquica de las fibras que constituyen el tejido conectivo, perdiendo la arquitectura típica del nervio periférico.

En las zonas desorganizadas se formaron pequeños fascículos desprovistos de perineuro, sin orientación paralela y en medio de tejido denso (figura 26).

Cabe destacar que, respecto al andamio que fue recelularizado e injertado en el modelo experimental, el grupo XR mostró una notable repoblación del segmento nervioso. La densidad celular tanto en A como en XR fue similar, y mayor respecto al control.

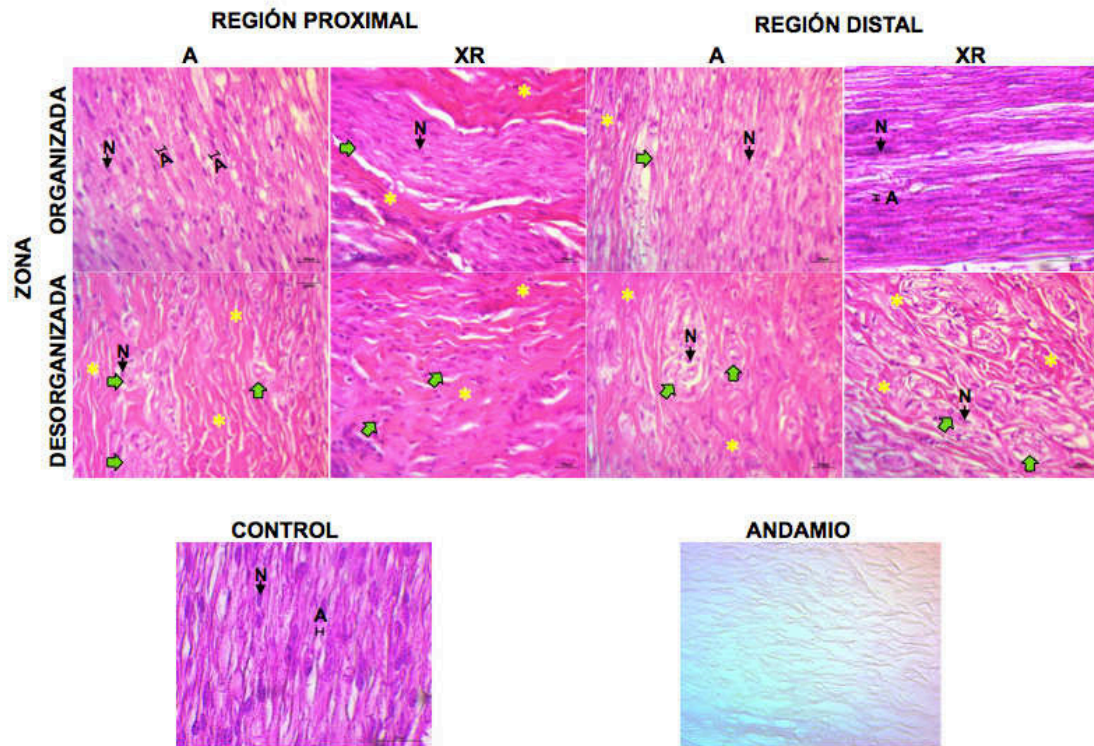


Figura 26. **Análisis morfológico de los grupos de estudio**

En ambos grupos experimentales se observaron zonas organizadas y desorganizadas, en las cuales los fascículos conservaban la arquitectura típica del nervio periférico. Destaca la gran cantidad de núcleos, principalmente en el grupo XR. Además, se aprecia la diferencia entre el andamio usado para el grupo XR y su aspecto en las regiones proximal y distal al cabo de 6 meses. Fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio ciático teñidas con H y E, amplificadas a 400X. **A**, Autoinjerto; **XR**, Xenoinjerto recelularizado; **Flechas verdes**, fascículos; *, tejido conectivo; **A**, axón y **N**, núcleo de CS.

9.5.4.2 Mielina

Mediante la técnica de K-B se identificaron los lípidos de la vaina de mielina. En el nervio control se identificó la mielina rodeando los axones en las estructuras fasciculares, este patrón se observó también en las zonas organizadas de los grupos A y XR). En el caso de las zonas desorganizadas, se detectó mielina en los pequeños fascículos (figura 27).

Cabe destacar que, al comparar las regiones proximal y distal XR vs el andamio, se observó remielinización del injerto, lo cual indica la repoblación del nervio por CS, presentes tanto en los fascículos organizados como en los desorganizados.

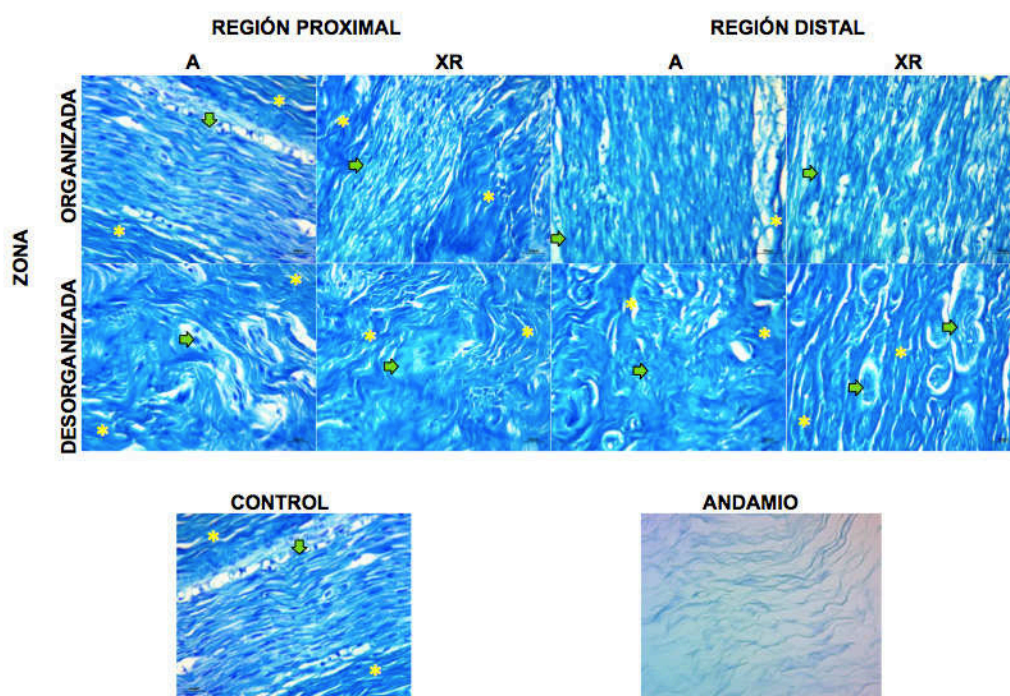


Figura 27. **Detección de mielina en los grupos de estudio**

Las estructuras fasciculares de ambas zonas evidenciaron la identificación de mielina. Se muestra una imagen del AA usado para el grupo XR y su aspecto en las regiones proximal y distal al cabo de 6 meses, evidenciando la remielinización. Fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio ciático teñidas con K-B, amplificadas a 400X. **A**, Autoinjerto; **XR**, Xenoinjerto recelularizado; **Flechas verdes**, fascículos y *, tejido conectivo.

9.5.4.3 Integridad axonal

A través de la impregnación argéntica fue posible analizar la arquitectura axonal dentro de los grupos de estudio (figura 30).

En el grupo control, los axones se observaron de manera organizada y continua, tanto en su longitud como calibre, presentando además el arreglo típico del nervio periférico. En las zonas organizadas, tanto de A como de XR, se conservó este patrón; en contraste con las regiones desorganizadas, en éstas los axones se observaron de forma desorganizada, mezclándose con las regiones de tejido conjuntivo y denotando pérdida de uniformidad y continuidad axonal.

Cabe destacar que al contrastar la integridad axonal del AA empleado para el grupo XR vs su aspecto al cabo de 6 meses del injerto; es posible evidenciar que, en las zonas ordenadas, se recuperó la continuidad axonal tanto en longitud como calibre, conservando la arquitectura típica del axón en el nervio periférico.

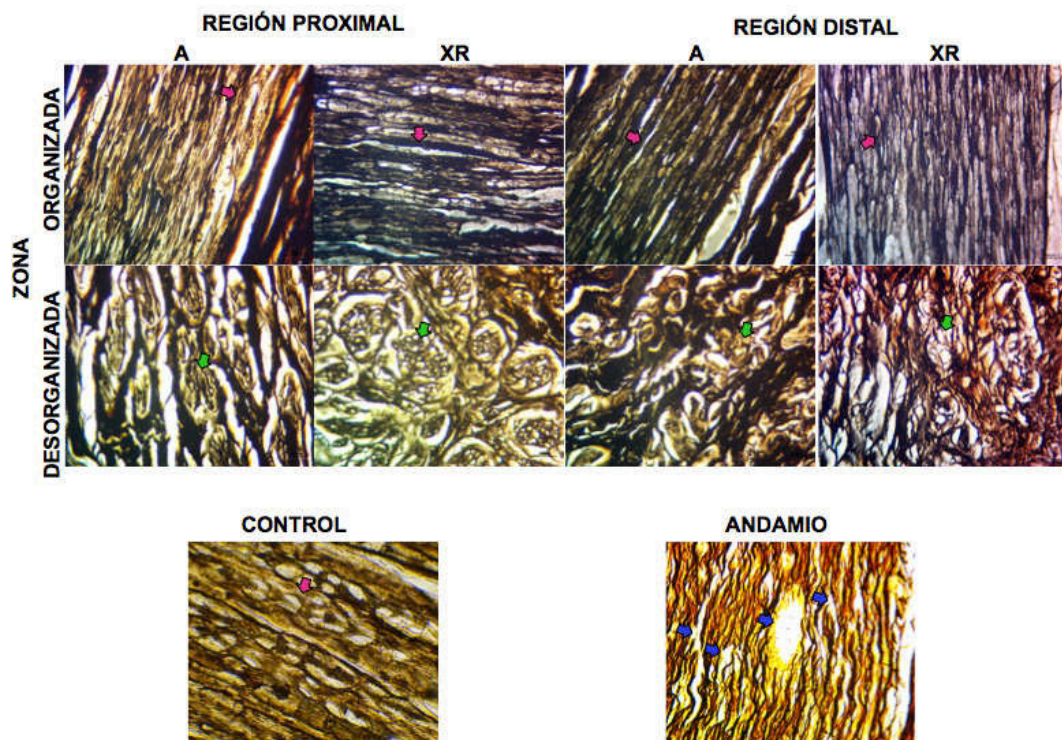


Figura 28. Análisis de la integridad axonal en los grupos de estudio

En el control, la arquitectura axonal se observa organizada y continua, tanto en su longitud como calibre, presentando además el arreglo típico del nervio periférico. Las zonas organizadas conservaron este patrón; sin embargo, en las zonas desorganizadas, los axones regeneraron de forma desordenada, mezclándose con las regiones de tejido conjuntivo y se observa pérdida de uniformidad y continuidad axonal. Adicionalmente, se aprecia la diferencia entre el AA usado para el grupo XR y su aspecto en las regiones proximal y distal al cabo de 6 meses. Fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio ciático teñidas con M-G-E, amplificadas a 400X. **A**, Autoinjerto; **XR**, Xenoinjerto recelularizado; **Flechas verdes**, fascículos; **Flechas rojas**, axones y **Flechas azules**, disrupción axonal.

9.5.4.4 MEC

LE

Mediante la histoquímica de PAS se detectaron los polisacáridos complejos de la LE, éstos denotaron positividad mediante color magenta (figura 29).

En el nervio control la LE se observa de manera organizada rodeando a las fibras nerviosas; estos hallazgos coinciden con lo observado en las zonas organizadas, en ambas regiones de los grupos experimentales. En las zonas desorganizadas, la LE también rodea a los pequeños fascículos desorganizados, pero conserva su estructura típica en zigzag.

En cuanto al grupo XR vs el AA, se observa como la estructura típica de la LE se conserva en los fascículos.

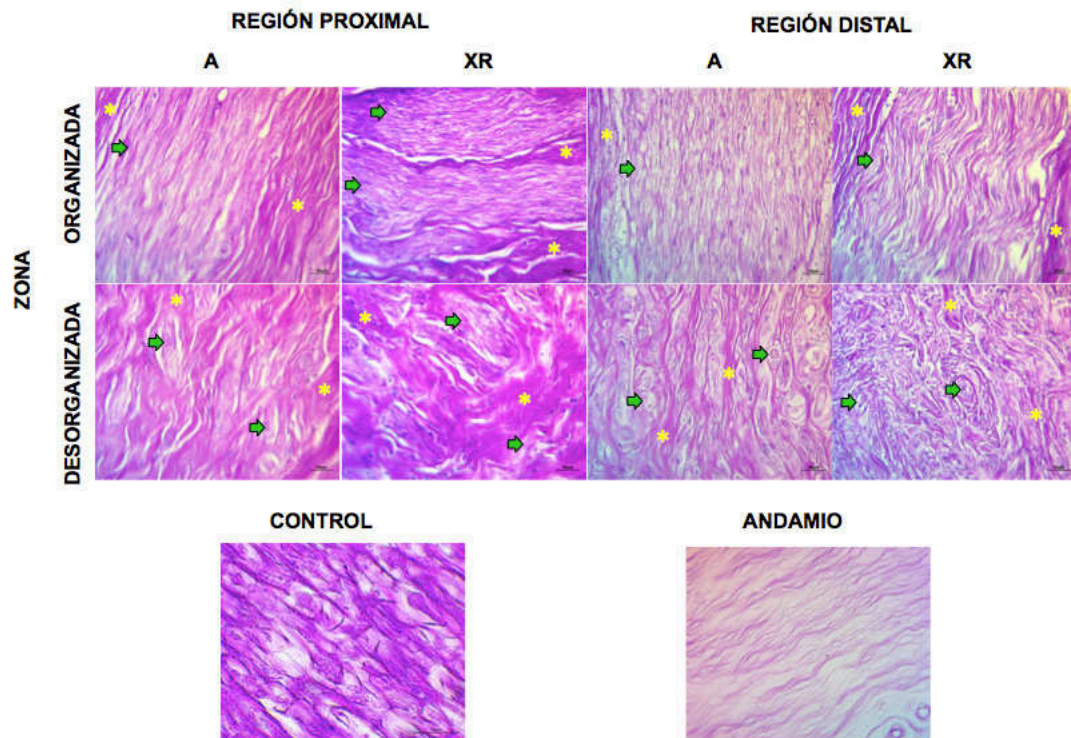


Figura 29. **Detección de polisacáridos complejos en la LE de los grupos de estudio**

En el control, la LE se presenta de manera ordenada rodeando a las fibras nerviosas, estos hallazgos coinciden con lo observado en las regiones proximal y distal de las zonas organizadas. Mientras que, en las zonas desorganizadas, la LE también rodean a los fascículos; destaca que a pesar de la desorganización de los fascículos, la LE conserva su estructura típica en zigzag. Se observa que la estructura de la LE en el AA perduró y se reforzó al cabo de 6 meses. Fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio ciático teñidas con PAS, amplificadas a 400X. **A**, Autoinjerto; **XR**, Xenoinjerto recelularizado; **Flechas verdes**, fascículos y *, tejido conectivo.

Fibras de colágeno

En el control, las fibras de colágeno se observan como líneas azules continuas y organizadas que conservan la estructura típica de la MEC. En las zonas organizadas de los grupos A y XR, la disposición de las fibras se observa similar al control; mientras que en las zonas desorganizadas se aprecia un alto grado de desorden y las fibras se encuentran de manera abundante (figura 30).

En cuanto al grupo XR vs el AA, se observa que la estructura típica de las fibras de colágeno se conservó.

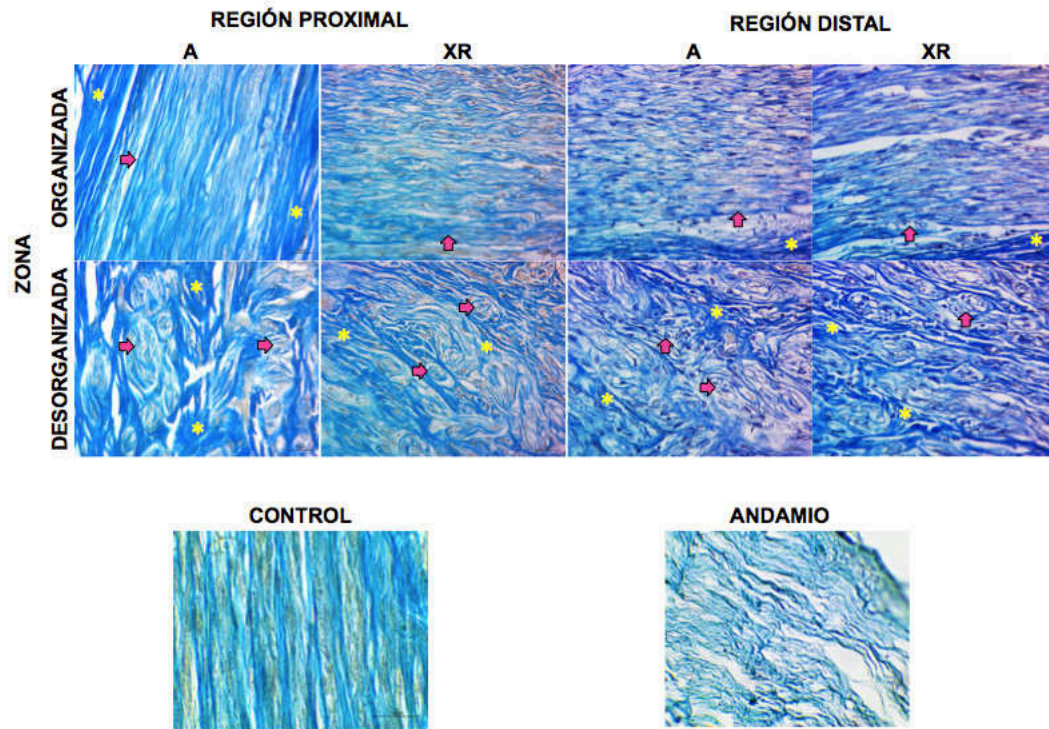


Figura 30. **Detección de fibras de colágeno en los grupos de estudio**

Tanto en el control como en las zonas organizadas, las fibras de colágeno conservan la estructura típica de la MEC. En las regiones desorganizadas las fibras son abundantes y se encuentran desorganizadas. La estructura de las fibras de colágeno en el AA perduró al cabo de 6 meses. Fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio ciático teñidas con M-TCM, amplificadas a 400X. **A**, Autoinjerto; **XR**, Xenoinjerto recelularizado; **Flechas rojas**, fascículos y *, tejido conectivo.

9.5.4.5 Otros hallazgos histológicos...

Se llevó a cabo el análisis de las zonas proximales y distales, cerca de los puntos de sutura (figura 31). En el grupo A no se encontraron hallazgos relevantes; sin embargo, en el grupo XR se encontraron focos de infiltrado inflamatorio (figura 31 XR.I) y zonas que coinciden con la descripción de un granuloma o necrosis caseosa (figura 31 XR.N), puesto que se observó una masa eosinófila, amorfa y delimitada por tejido conectivo seguido de una superficie inflamatoria.

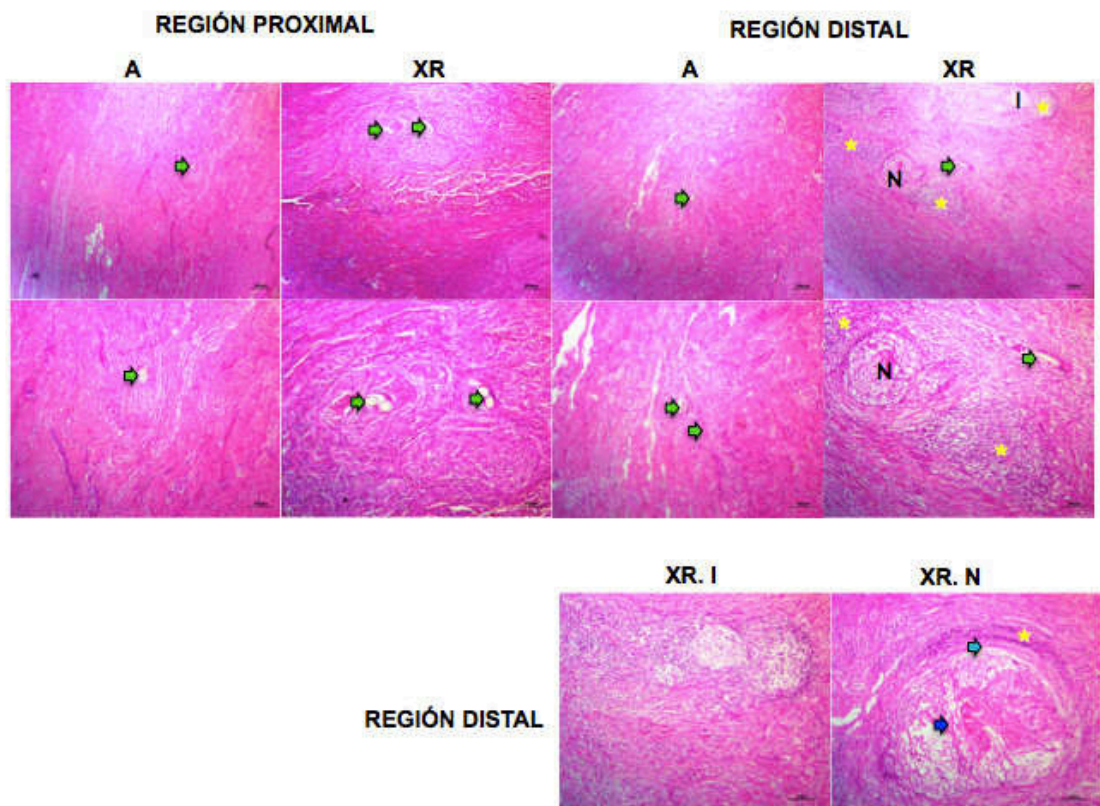


Figura 31. Hallazgos histológicos en la periferia de las suturas a los 6 meses post-quirúrgicos

Fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio ciático teñidas con H y E, amplificadas a 40 y 100X, excepto XR.I y XR.N (400X). **A**, Autoinjerto; **XR**, Xenoinjerto recelularizado; **Flechas verdes**, puntos de sutura; *, tejido conectivo; **Flecha celeste**, tejido conectivo; **Flecha azul rey**, zona necrótica; **N**, necrosis caseosa; **XR.I**, infiltrado inflamatorio en el grupo XR y **XR.N**, zona necrótica en el grupo XR.

9.5.4.5 Inmunomarcaje

En la figura 32 se observan los resultados obtenidos para las CS mediante el marcador de identidad positivo S-100. Tanto en las zonas organizadas, como desorganizadas; así como en la región proximal y distal de A y XR, se presentó marcaje positivo. Estos resultados son consistentes con los observados en la técnica de K-B; demostrando que los fascículos están formados por CS.

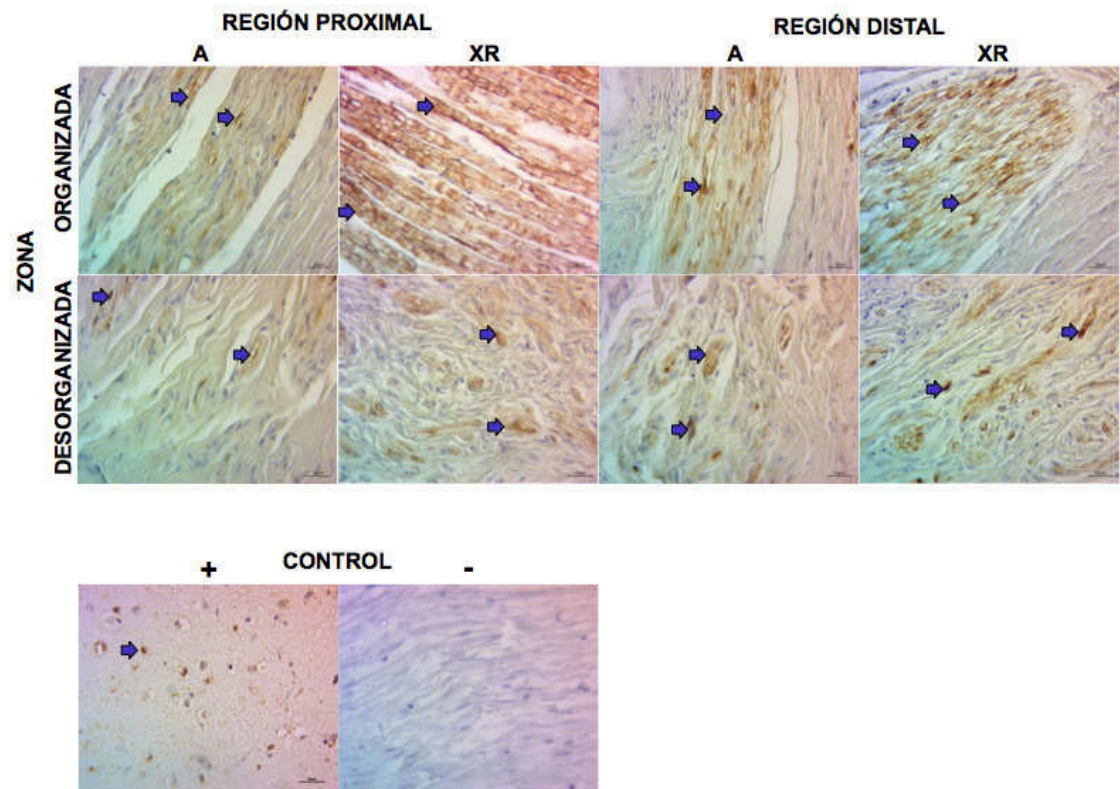


Figura 32. Inmunomarcaje para CS mediante S-100

En color marrón se observa positividad para S-100, indicando la presencia de CS en el tejido. Fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio ciático, amplificadas a 400X. **A**, Autoinjerto; **XR**, Xenoinjerto recelularizado; **control -**, nervio periférico; **control +**, cerebro de ovino, marcaje + para oligodendrocitos y **flechas azules**, marcaje +.

Por otra parte, en la figura 33 se evidencia el patrón de marcaje para neurofilamentos mediante el marcador para la subunidad pesada (200kD). Al igual que en el caso anterior, hubo marcaje positivo en ambas zonas de los injertos en las regiones proximal y distal. Los resultados coinciden con lo observado en la impregnación argéntica de M-G-E, demostrando la estructura e identidad de los axones tanto dentro de los fascículos organizados, como los desorganizados.

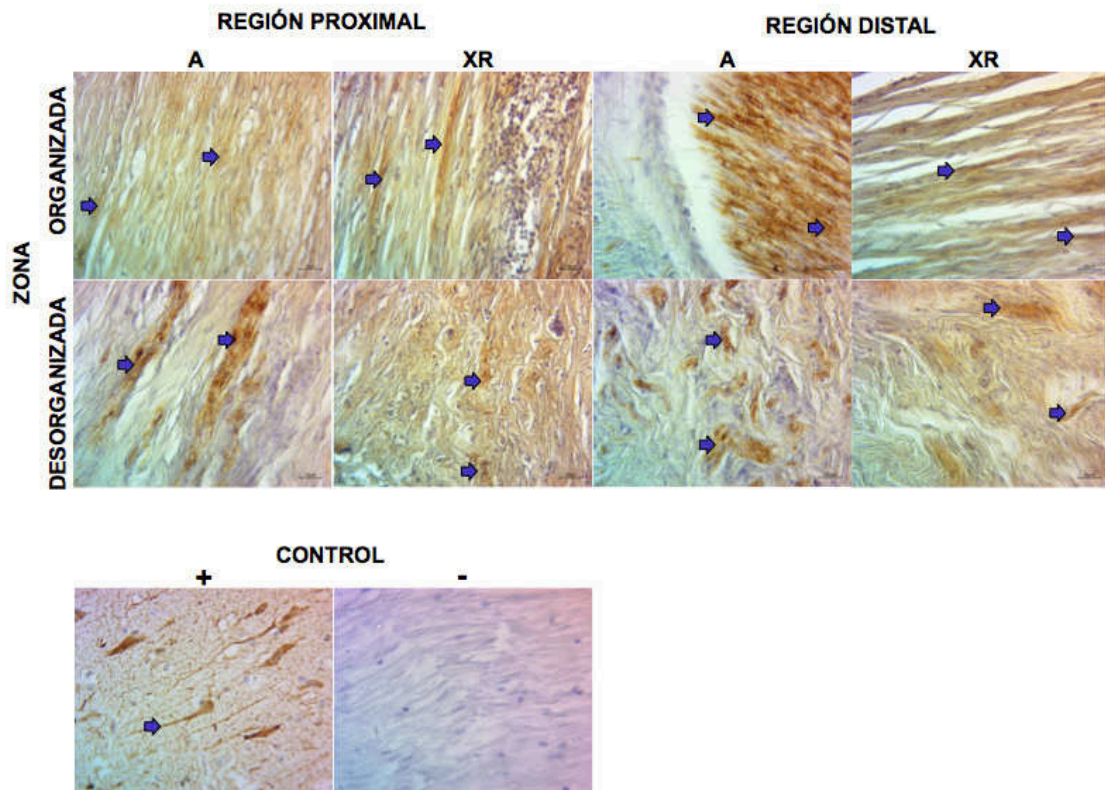


Figura 33. **Inmunomarcaje para NF-200kD**

En color marrón se indica la positividad para NF-200kD. Fotomicrografías de secciones longitudinales de nervio ciático, amplificadas a 400X. **A**, Autoinjerto; **XR**, Xenoinjerto recelularizado; **control -**, nervio periférico; **control +**, cerebro de ovino y **flechas azules**, marcaje +.

9.5.5 Análisis morfométrico y estadístico

Mielina

Se observaron diferencias significativas respecto a la cantidad de mielina cuantificada entre la regiones proximal y distal de A. Al comparar esta misma región vs el control se observó diferencia significativa también. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (figura 34).

Axones

Tras la evaluación morfométrica de la impregnación argéntica de M-G-E, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (figura 34).

MEC: polisacáridos complejos de la LE

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la cantidad de polisacáridos complejos positivos cuantificados entre grupos (figura 34).

MEC: fibras de colágeno

La proporción de fibras de colágeno cuantificadas mostró diferencias significativas entre las regiones proximales de los grupos experimentales; sin embargo, no se observaron diferencias respecto al control, ni en la zona distal (figura 34).

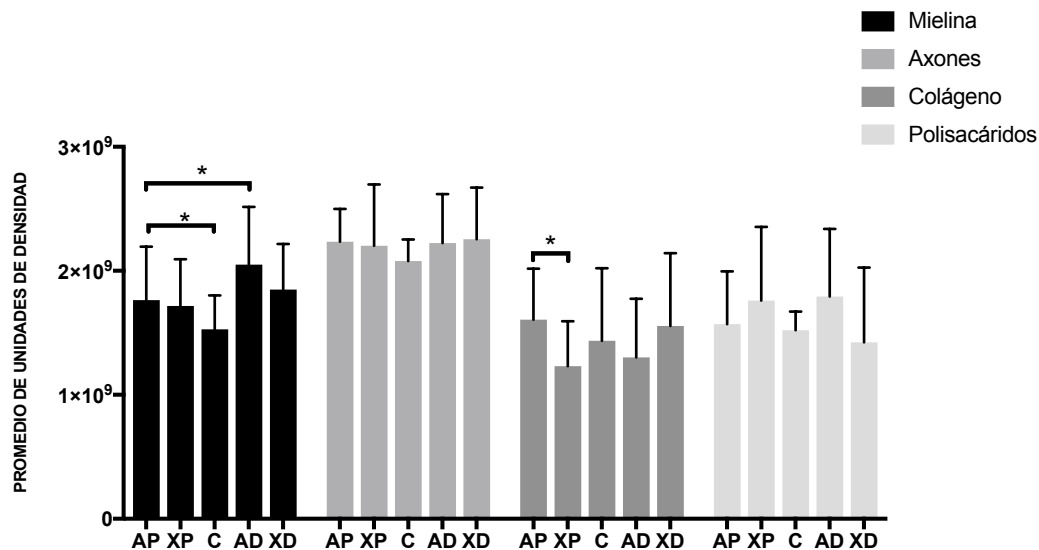


Figura 34. **Análisis densitométrico de mielina, axones, fibras de colágeno y polisacáridos entre los grupos de estudio y el control no tratado.**

Se llevó a cabo la evaluación morfométrica de mielina, axones, polisacáridos complejos de la LE y fibras de colágeno en los grupos experimentales. Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cuantificación de mielina respecto a la región proximal del grupo A vs su región proximal y el control; y en las fibras de colágeno, respecto a las regiones proximales de los grupos experimentales. Los datos se presentan como media \pm DS [A y XR n=5, C n=10; ANOVA y post-hoc de Scheffé (mielina, polisacáridos y fibras de colágeno), Kruskal Wallis (axones)]. *p < 0.05.

CAPÍTULO X. DISCUSIÓN

Preparación del AA

Los aloinjertos de MEC se han convertido en una alternativa viable al tradicional autoinjerto. Actualmente, esta tecnología ya se encuentra disponible y se ha demostrado su seguridad y eficacia en estudios clínicos multicéntricos [105-107]. Considerando el éxito del uso de tejido alogénico procesado, se espera que el tejido xenogénico también pueda ser eficaz en la reconstrucción de LNP con brecha, brindando una fuente ilimitada en materia de reparación. Sin embargo, hay poca información disponible acerca de los resultados de injertos descelularizados entre diferentes especies [33, 112]; con base en esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad regenerativa y funcional de un xenoinjerto de origen cadavérico humano, recelularizado con CtS alogénicas, en un modelo animal ovino vs el autoinjerto.

Descelularización

En este trabajo se implementó el método de descelularización optimizado por García-Pérez *et al.*, 2016, ya que su efectividad ha sido previamente probada en un modelo alogénico en roedores [110]. Los parámetros de calidad y de eficiencia se analizaron con base en pruebas morfológicas y, tras el análisis de los resultados, se evidenció que el proceso de descelularización fue exitoso, lo cual es crucial para evitar una reacción inmune en el paciente [113].

La mielina corresponde a la membrana plasmática de las CS organizada en una vaina que se envuelve varias veces en el axón [3]; por lo cual, el análisis de este componente o sus retos también refleja el éxito del proceso de descelularización. Se ha demostrado que los restos de mielina afectan la velocidad de regeneración axonal, inhibiendo el crecimiento de los axones e impidiendo la regeneración misma de mielina en el axón [114-117]. Con base en lo anterior, se analizó la presencia de mielina en el nervio procesado y se observó que, respecto al control, este proceso conlleva una remoción eficiente de la misma; lo que a su vez comprueba el éxito del proceso de descelularización.

Cuando existe daño en los axones por neuropatías, estos sufren alteraciones a causa de desmielinización [118]. En el presente estudio la remoción de las células y mielina pudo afectar severamente la integridad axonal. Esto se evidenció con la impregnación argéntica de M-G-E.

Preservación de la MEC

Durante la preparación de un AA es indispensable conservar la MEC íntegra para que se dé una adecuada regeneración nerviosa[119]; esto reside en que sus componentes, participan en procesos celulares tales como regeneración, migración, cicatrización, diferenciación y organización; además de fungir como soporte para las CS. Ide *et al.*[120] evidenciaron que la LE de su AA actuó como sustrato para el crecimiento axonal y resultó una vía eficaz para el mantenimiento de la regeneración axonal. Con base en lo anterior, se analizó el grado de conservación de la LE y de las fibras de colágeno en el nervio descelularizado; y se observó que ambas estructuras se conservaron y mantuvieron el arreglo típico que poseen de manera nativa en el nervio periférico. Además, mediante el análisis densitométrico, se demostró que la cantidad de componentes (polisacáridos complejos y fibras de colágeno) no varían en el nervio tratado respecto al control.

Recelularización *in vitro* del AA e injerto en el modelo animal

La diferencia sustancial entre los injertos de MEC y los autólogos son las CS, factor clave en la regeneración del nervio periférico [74]. Las CS desempeñan un papel decisivo en la regeneración nerviosa, puesto que secretan NGFs que promueven la regeneración axonal; sin embargo, cuando se encuentran en una fibra nerviosa denervada, pierden progresivamente su capacidad de expresar genes que participan en la regeneración, es decir se desactivan [121]. El empleo de CS autólogas está limitado por problemas tales como la fuente de obtención (biopsia de nervio autólogo), dificultad de expansión, problemas de almacenamiento a largo plazo, dificultad de purificación y falta de disponibilidad.

Las células madre poseen potencial de diferenciación multidireccional y una serie de ventajas clínicas, tales como accesibilidad, rápida proliferación *in vitro* e integración

exitosa en el tejido huésped con una baja respuesta inmune. Aunque las células madre han demostrado ser benéficas para la reparación de LNP, estudios han intentado pre-diferenciar estas células *in vitro* a CtS, ya que esto puede reducir la diferenciación de fenotipos no deseables y el riesgo de formación de tumores. Además, las CtS han mostrado mejores resultados en regeneración nerviosa que las células madre indiferenciadas. Fan *et al.* [122] complementó un AA con CtS inducidas a partir de CEMO para reparar defectos nerviosos y obtuvo mejores resultados que con células no diferenciadas; estos mismos resultados fueron evidenciados por Jiang *et al.*[82] mediante el uso de CtS diferenciadas a partir de CMM-TA. Adicionalmente García-Pérez *et al.*[110] demostraron la superioridad regenerativa de CtS en AA respecto al autoinjerto en modelos murinos. Las CMM-TA son fáciles de obtener y se encuentran disponibles en grandes cantidades, lo que permite que sean empleadas como una fuente estable de agentes terapéuticos celulares [75, 123]. En este trabajo, las CMM-TA aisladas de ovino, exhibieron morfología fibroblastoide con expresión positiva por ICQ de CD90 y CD105, lo cual indica el éxito en el proceso de aislamiento.

Previamente García-Pérez *et al.*[110] indujeron la diferenciación a CtS. La concentración adecuada de β -mercaptoetanol [124] y ATRA [125] promueve la diferenciación de CMM a células neurales. Mientras que forskolina, β FGF, PDGF y 1β -heregulina pueden promover a las células nerviosas para diferenciarse en células perigliales [126]. En nuestro estudio, dos semanas después de la inducción las células se observaron más polarizadas y mostraron expresión positiva por ICQ del marcador de superficie S-100 presente en CS; esto concuerda con inducciones realizadas en otros estudios; sin embargo, en estos la expresión se determinó por ensayos de Western Blot [33, 80, 108]. En este estudio el uso de CMM-TA diferenciadas a CtS podría resolver las limitantes de las CS autólogas, ya que se obtuvo un porcentaje considerable de células que expresaron la proteína S-100 (marcador específico del tejido nervioso), lo cual sugiere un mayor éxito en el papel regenerativo de estas células. Este método representa una alternativa atractiva ante el uso de CS autólogas. Debido al éxito del AA recelularizado con CtS alogénicas en el trabajo llevado a cabo por García-Pérez *et al.*, se presentó la necesidad de escalar el modelo animal de experimentación. En la reconstrucción de LNP se ha trabajado con modelos de tamaño medio tales como primates[77, 80], caninos[69] y ovinos[127-129]; sin embargo, las condiciones experimentales han sido distintas respecto a los parámetros establecidos

para este trabajo (andamios sintéticos, uso exclusivo de AA y células madre, MEC alogénicas, etc.).

Los ovinos se distinguen por ser un modelo pre-clínico valioso y muy noble; puesto que la morfología del nervio periférico es similar a la del humano, representan un beneficio costo-efectividad respecto a otros modelos de tamaño medio y además son herbívoros, a diferencia de otros modelos no tienden a la automutilación. El empleo de esta especie en nuestro trabajo, representa un acercamiento al estudio de modelos heterólogos en especies de tamaño mediano, ya que conlleva el uso de MEC xenogénica humana en combinación CtS alogénicas en la reparación de una LNP distal (nervio ciático); lo cual no ha sido reportado previamente.

Evaluación de la recuperación funcional y determinación del grado de regeneración nerviosa

La evaluación neurofisiológica, la relación de peso húmedo muscular y el análisis morfológico de los componentes en los injertos (repoblación celular, mielina, axones, fibras de colágeno, LE, neurofilamentos y la proteína S-100) fueron los indicadores objetivos para medir la reparación de las LNP. Las pruebas neurofisiológicas pueden reflejar de manera objetiva y exacta la función de las fibras nerviosas regeneradas. La relación de peso húmedo refleja la asociación entre la recuperación neurológica y la función del órgano diana. La cuantificación de los componentes morfológicos en las fibras nerviosas fueron indicadores cualitativos y cuantitativos intuitivos; y el análisis de la vaina de mielina, S-100, neurofilamentos y la integridad axonal, fueron indicadores cualitativos y cuantitativos de regeneración axonal.

En el análisis neurofisiológico, los grupos A y XR mostraron resultados estadísticamente iguales respecto a la evaluación en el músculo proximal, bíceps femoral (neurofisiología: latencia, VC y amplitud; relación de peso húmedo y componentes morfológicos); sin embargo, respecto al músculo gastrocnemio o distal, se observaron diferencias significativas ante la relación de peso húmedo y latencia. Estas diferencias fueron consistentes con el análisis macroscópico de las piezas musculares, ya que a pesar de que en ambos grupos se observaba atrofia muscular, en la extremidad intervenida, en el grupo XR ésta era más pronunciada. Cabe destacar, que la latencia y la VC son parámetros importantes en el análisis neurofisiológico,

puesto que son indicadores de desmielinización o remielinización y se encuentran afectando la conducción del impulso nervioso; sin embargo, la amplitud es el parámetro de mayor relevancia en el aspecto regenerativo. La amplitud indica el número de fibras que inervan el músculo, es decir el número de fibras regeneradas, por lo que este parámetro es empleado para determinar el grado de regeneración neural dentro del músculo [78, 128]. Por lo tanto, nuestros hallazgos muestran, respecto al control, que la inervación no se recupera completamente, incluso si el nervio parece recuperarse; no obstante, el grado de regeneración se muestra igual ante los grupos A y XR, puesto que sus valores de amplitud son estadísticamente iguales.

Por otro lado, el aumento en la magnitud de latencia y el decremento de la VC y amplitud en los grupos experimentales respecto al control, se explica con los hallazgos morfológicos encontrados, ya que en ambos injertos predominaban zonas en donde los componentes se encontraban desorganizados, presentando fascículos discontinuos y rodeados de un entramado de tejido conjuntivo. Esta desorganización podría haber provocando un bloqueo en la transmisión del potencial de acción, lo que explicaría el cambio en los valores de las pruebas funcionales.

Además, respecto al análisis morfológico, es importante señalar que en el grupo de XR se apreciaban focos de infiltrado inflamatorio y hallazgos histológicos que correspondían con la descripción de un granuloma o necrosis caseosa, esto cerca de las suturas del injerto. Lo anterior podría explicarse por un proceso de inflamación crónica, causado por una reacción a cuerpo extraño a causa de las suturas o a una reacción inmune ante los componentes del XR [130]. Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales, no es posible explicar la causa de estos hallazgos. Aunado a esto, el tiempo de recuperación post-injerto representó una limitante en nuestro estudio, ya que es difícil descifrar el fenómeno que está ocurriendo respecto a la topografía del nervio ya que no podemos atribuir esas regiones desorganizadas a alguna de las siguientes posibilidades: a) parte del proceso de regeneración que no se ha completado y en el que pueden verse involucrados procesos de hipertrofia y/o posterior remodelación, b) tampoco se puede descartar si esas zonas se organizarían con el tiempo o si es una falla que persistirá a lo largo del tiempo, dificultando una recuperación al 100% de la lesión del nervio periférico, c) si esta desorganización se debe a la falta de algún componente esencial en la regeneración que no está presente en nuestros ensayos.

A pesar de lo anterior, los resultados indican una gran similitud entre los grupos A y XR en todos los parámetros analizados. Cabe destacar que a pesar de que la estructura inicial de ambos injertos era diferente, tras 6 meses parece que ambos injertos pasaron por un proceso similar, lo cual bien podría indicar que se trate de un proceso regenerativo en curso. Además estos resultados hablan acerca de la sinergia que existe entre las CS y la MEC en la regeneración y de cómo en el grupo de XR está siendo ejercida por las CtS y la MEC xenogénica.

Los resultados de este estudio coinciden con los de Radtke *et al.*[129], en el cual se comparó la eficiencia de un AA sintético frente al autoinjerto en una lesión de nervio ciático de un modelo ovino por un periodo de 6 y 10 meses. No se observaron mejorías funcionales significativas y esto se evidenció con los hallazgos morfológicos. Por otro lado Jiang *et al.*[82] a las 12 semanas de la reparación de una lesión en un modelo murino observó mejorías con aloinjertos de MEC recelularizados con CtS; sin embargo éstos aún no mostraron ser mejores respecto al autoinjerto.

El presente trabajo describe por primera vez que un xenoinjerto de origen humano, recelularizado con CMM-TA diferenciadas *in vitro* a CtS, posee una capacidad regenerativa similar a la del autoinjerto (estándar de oro en reparación).

Una de las fortalezas del presente estudio es el uso de modelos ovinos, lo cual facilita la extrapolación de los resultados a los seres humanos, aunque estos implican un mayor costo respecto a los roedores empleados en otros estudios[82, 110]. Otra característica importante del estudio es la recopilación y comparación de datos morfológicos y anatómicos con datos neurofisiológicos, pues estos proporcionan información sobre la fibra nerviosa y su función. Los métodos utilizados en nuestro trabajo correlacionan con estudios centrados en patología neural [131].

Una limitante en nuestro estudio es el pequeño tamaño de la muestra y la ventana de tiempo; sin embargo, las similitudes y diferencias encontradas entre el A y el XR justifican continuar investigando en esta área, puesto que el estándar de oro fue comparado con una estrategia de reparación basada en tejido de origen cadavérico, que podría representar un stock ilimitado de material clínico que, con puntos de mejora, en un futuro podría competir con el uso de autoinjerto para la reparación de LNP.

Si bien planteamos muchos dilemas en términos de posibles problemas que deben superarse antes de la traducción a un estudio clínico utilizando este enfoque, esto no resta importancia a los hallazgos experimentales de este trabajo. Claramente existe

una fuerte necesidad de establecer métodos alternativos fiables para la reparación de defectos nerviosos en la práctica clínica. Además, se requiere llevar a cabo estudios a más largo plazo y con una n mayor, así como también experimentar con diferentes sitios de lesión del nervio ciático para observar si las diferencias observadas en los músculos proximales y distales varían con respecto a su posición y al sitio de la lesión; o si la movilidad se recupera al incrementar el tiempo de recuperación. Otra alternativa consistiría en realizar estudios que evalúen el posible uso de xenoinjertos entre especies (distintas a las de este estudio), ya que implicaría llevar un material de desecho de rastro a una alternativa terapéutica.

CAPÍTULO XI. CONCLUSIONES

- 1) Se logró la preparación de un AA, a partir de nervio cadavérico humano, que conserva los componentes de la MEC.
- 2) Las CMM-TA de ovejas no relacionadas genéticamente y diferenciadas *in vitro* a CtS, fueron capaces de recelularizar el xenoinjerto y de reproducir el microambiente regenerativo del nervio.
- 3) *In vivo*, se observó que el efecto regenerativo y funcional del A y XR fue similar; sin embargo, se requiere incrementar el tiempo de observación, para evaluar la posible regeneración completa.

CAPÍTULO XII. PERSPECTIVAS

- Incrementar el tiempo del estudio para evaluar:
 - ✓ El seguimiento del proceso regenerativo
 - ✓ La evolución de los focos de infiltrado inflamatorio y necrosis en el XR
- Llevar a cabo pruebas de biocompatibilidad en el andamio
- Probar otros componentes como la digestión de condroitín sulfato que se ha reportado que incrementa la regeneración.
- Analizar la expresión génica en la regeneración nerviosa
- Analizar la expresión de citocinas involucradas en la reparación nerviosa
- Implementar la técnica de ultrasonido como herramienta en la regeneración nerviosa
- Seguimiento en pruebas neurofisiológicas (pre y post-quirúrgico, al mes 2, 4 etc.)

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Sepúlveda Saavedra, Texto atlas de histología: biología celular y tisular, McGraw Hill Mexico, 2013.
- [2] L.P.H. Gartner, J.L.L.P. Gartner, J.L. Hiatt, Texto atlas de histología, McGraw Hill, 2008.
- [3] J.S. Saavedra, Texto atlas de histología: biología celular y tisular, McGraw-Hill Interamericana, 2000.
- [4] R.L. Drake, W. Vogl, A.W. Mitchell, Gray Anatomía para estudiantes, Elsevier España, 2010.
- [5] E.N. Marieb, Essentials of anatomy and physiology, (2008).
- [6] D. Shier, J. Butler, R. Lewis, Hole's essentials of human anatomy and physiology, McGraw-Hill New York, 2006.
- [7] A.C. Guyton, J.E.A.C. Hall, E. John, A.C. Guyton, A.C. Guyton, A.C. Guyton, I. Fernández Bernaldo de Quirós, A.C. Guyton, J.L. Agud Aparicio, I. Alvarez Baleriola, Tratado de fisiología médica, Elsevier, 2011.
- [8] J.W. Kalat, Psicología biológica, Editorial Paraninfo, 2004.
- [9] M.L. Castillo-Galván, F.M. Martínez-Ruiz, Ó. de la Garza-Castro, R.E. Elizondo-Omaña, S. Guzmán-López, Estudio de la lesión nerviosa periférica en pacientes atendidos por traumatismos, Gaceta Médica de México, 150 (2014) 527-532.
- [10] J. Garrido-Gómez, P. Hernández-Cortés, V.S. Carriel Araya, S. García García, J.A. Sáez Moreno, M. Alaminos Mingorance, J. Torres Barroso, Tratamiento de las lesiones de los nervios periféricos. Tendencias actuales del tratamiento quirúrgico, (2012).
- [11] W.W. Campbell, Evaluation and management of peripheral nerve injury, Clinical neurophysiology, 119 (2008) 1951-1965.
- [12] H.S. Seddon, Surgical disorders of the peripheral nerves, (1975).
- [13] S. Sunderland, The intraneural topography of the radial, median and ulnar nerves, Brain, 68 (1945) 243-298.
- [14] U. Dornseifer, K. Matiassek, M. Fichter, A. Rupp, J. Henke, N. Weidner, L. Kovacs, W. Schmahl, E. Biemer, M. Ninkovic, Surgical therapy of peripheral nerve lesions: current status and new perspectives, Zentralblatt für Neurochirurgie-Central European Neurosurgery, 68 (2007) 101-110.
- [15] A. Waller, Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 140 (1850) 423-429.
- [16] C.E. Schmidt, J.B. Leach, Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration, Annual review of biomedical engineering, 5 (2003) 293-347.
- [17] J. Scheib, A. Höke, Advances in peripheral nerve regeneration, Nature Reviews Neurology, 9 (2013) 668-676.
- [18] G. Stoll, J. Griffin, C.Y. Li, B.D. Trapp, Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation, Journal of neurocytology, 18 (1989) 671-683.
- [19] L. Lundy-Ekman, Neuroscience: fundamentals for rehabilitation, Elsevier Health Sciences, 2013.
- [20] M.C. Harrisingh, E. Perez - Nadales, D.B. Parkinson, D.S. Malcolm, A.W. Mudge, A.C. Lloyd, The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation, The EMBO journal, 23 (2004) 3061-3071.
- [21] R. Junka, X. Yu, Novel Acellular Scaffold Made from Decellularized Schwann Cell Sheets for Peripheral Nerve Regeneration, Regenerative engineering and translational medicine, 1 (2015) 22-31.
- [22] J.T. Oliveira, C. de Oliveira Goulart, S.V.S. de Lima, H.R. Mendonça, K.M. de Andrade, A.F. Baptista, A.M.B. Martinez, Peripheral Nervous System: Regenerative Therapies, in: Regenerative Medicine-from Protocol to Patient, Springer, 2016, pp. 147-178.
- [23] A. Höke, R. Redett, H. Hameed, R. Jari, C. Zhou, Z. Li, J. Griffin, T. Brushart, Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration, The Journal of neuroscience, 26 (2006) 9646-9655.

- [24] A. Moradzadeh, G.H. Borschel, J.P. Luciano, E.L. Whitlock, A. Hayashi, D.A. Hunter, S.E. Mackinnon, The impact of motor and sensory nerve architecture on nerve regeneration, *Experimental neurology*, 212 (2008) 370-376.
- [25] L.H. Poppler, K. Davidge, J.C. Lu, J. Armstrong, I.K. Fox, S.E. Mackinnon, Alternatives to sural nerve grafts in the upper extremity, *Hand*, 10 (2015) 68-75.
- [26] P. Konofaos, J.K. Terzis, FK506 and nerve regeneration: past, present, and future, *Journal of reconstructive microsurgery*, 29 (2013) 141-148.
- [27] T.H. Tung, Tacrolimus (FK506): safety and applications in reconstructive surgery, *Hand*, 5 (2010) 1-8.
- [28] M.J. Brenner, J.N. Jensen, J.B. Lowe III, T.M. Myckatyn, I.K. Fox, D.A. Hunter, T. Mohanakumar, S.E. Mackinnon, Anti-CD40 ligand antibody permits regeneration through peripheral nerve allografts in a nonhuman primate model, *Plastic and reconstructive surgery*, 114 (2004) 1802-1814.
- [29] T.A. Davis, K. Anam, Y. Lazdun, J.M. Gimble, E.A. Elster, Adipose-derived stromal cells promote allograft tolerance induction, *Stem cells translational medicine*, 3 (2014) 1444.
- [30] X. Huang, Q. Zhu, L. Jiang, C. Zheng, Z. Zhu, Q. Lu, Y. Xu, L. Gu, X. Liu, [Study on immune response after repair of nerve defect with acellular nerve xenograft laden with allogenic adipose-derived stem cells in rhesus monkey], *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi= Zhongguo xiu fu chongjian waikē zazhi= Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, 26 (2012) 993-1000.
- [31] M.A. Chernousov, W.M. Yu, Z.L. Chen, D.J. Carey, S. Strickland, Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix, *Glia*, 56 (2008) 1498-1507.
- [32] R. Deumens, A. Bozkurt, M.F. Meek, M.A. Marcus, E.A. Joosten, J. Weis, G.A. Brook, Repairing injured peripheral nerves: bridging the gap, *Progress in neurobiology*, 92 (2010) 245-276.
- [33] Y. Zhang, H. Luo, Z. Zhang, Y. Lu, X. Huang, L. Yang, J. Xu, W. Yang, X. Fan, B. Du, A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 31 (2010) 5312-5324.
- [34] I. Allodi, E. Udina, X. Navarro, Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level, *Progress in neurobiology*, 98 (2012) 16-37.
- [35] S.N. Masand, I.J. Perron, M. Schachner, D.I. Shreiber, Neural cell type-specific responses to glycomimetic functionalized collagen, *Biomaterials*, 33 (2012) 790-797.
- [36] A. Bozkurt, G.A. Brook, S. Moellers, F. Lassner, B. Sellhaus, J. Weis, M. Woeltje, J. Tank, C. Beckmann, P. Fuchs, In vitro assessment of axonal growth using dorsal root ganglia explants in a novel three-dimensional collagen matrix, *Tissue engineering*, 13 (2007) 2971-2979.
- [37] F. Stang, H. Fansa, G. Wolf, G. Keilhoff, Collagen nerve conduits—assessment of biocompatibility and axonal regeneration, *Bio-medical materials and engineering*, 15 (2005) 3-12.
- [38] S.W. Kemp, S. Syed, S.K. Walsh, D.W. Zochodne, R. Midha, Collagen nerve conduits promote enhanced axonal regeneration, schwann cell association, and neovascularization compared to silicone conduits, *Tissue Engineering Part A*, 15 (2009) 1975-1988.
- [39] S.L. Palm, L.T. Furcht, Production of laminin and fibronectin by Schwannoma cells: cell-protein interactions in vitro and protein localization in peripheral nerve in vivo, *The Journal of cell biology*, 96 (1983) 1218-1226.
- [40] F.M. Longo, E.G. Hayman, G.E. Davis, E. Ruoslahti, E. Engvall, M. Manthorpe, S. Varon, Neurite-promoting factors and extracellular matrix components accumulating in vivo within nerve regeneration chambers, *Brain research*, 309 (1984) 105-117.
- [41] A.D. Lander, D.K. Fujii, L.F. Reichardt, Purification of a factor that promotes neurite outgrowth: isolation of laminin and associated molecules, *The Journal of cell biology*, 101 (1985) 898-913.
- [42] R. Martini, Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves, *Journal of neurocytology*, 23 (1994) 1-28.
- [43] S.Y. Fu, T. Gordon, The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration, *Molecular neurobiology*, 14 (1997) 67-116.

- [44] P.D. Yurchenco, S. Smirnov, T. Mathus, Analysis of basement membrane self-assembly and cellular interactions with native and recombinant glycoproteins, *Methods in cell biology*, 69 (2002) 111-144.
- [45] W. Sun, C. Sun, H. Zhao, H. Lin, Q. Han, J. Wang, H. Ma, B. Chen, Z. Xiao, J. Dai, Improvement of sciatic nerve regeneration using laminin-binding human NGF- β , *PLoS One*, 4 (2009) e6180.
- [46] S. Plantman, M. Patarroyo, K. Fried, A. Domogatskaya, K. Tryggvason, H. Hammarberg, S. Cullheim, Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons in vitro, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39 (2008) 50-62.
- [47] X. Gao, Y. Wang, J. Chen, J. Peng, The role of peripheral nerve ECM components in the tissue engineering nerve construction, *Reviews in the neurosciences*, 24 (2013) 443-453.
- [48] M. Patel, P.J. VandeVord, H.W. Matthew, S. DeSilva, B. Wu, P.H. Wooley, Functional gait evaluation of collagen chitosan nerve guides for sciatic nerve repair, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 14 (2008) 365-370.
- [49] J. Cao, C. Sun, H. Zhao, Z. Xiao, B. Chen, J. Gao, T. Zheng, W. Wu, S. Wu, J. Wang, The use of laminin modified linear ordered collagen scaffolds loaded with laminin-binding ciliary neurotrophic factor for sciatic nerve regeneration in rats, *Biomaterials*, 32 (2011) 3939-3948.
- [50] M. Krolo, K. Vilovic, D. Sapunar, E. Vrdoljak, M. Saraga-Babic, Fibronectin expression in the developing human spinal cord, nerves, and ganglia, *Croatian medical journal*, 39 (1998) 386-391.
- [51] E.S. White, A.F. Muro, Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models, *IUBMB life*, 63 (2011) 538-546.
- [52] M.J. Humphries, S.K. Akiyama, A. Komoriya, K. Olden, K.M. Yamada, Neurite extension of chicken peripheral nervous system neurons on fibronectin: relative importance of specific adhesion sites in the central cell-binding domain and the alternatively spliced type III connecting segment, *The Journal of cell biology*, 106 (1988) 1289-1297.
- [53] A. Baron-Van Evercooren, H.K. Kleinman, H. Seppä, B. Rentier, M. Dubois-Dalcq, Fibronectin promotes rat Schwann cell growth and motility, *The Journal of cell biology*, 93 (1982) 211-216.
- [54] D. Aquino, R. Margolis, R. Margolis, Immunocytochemical localization of a chondroitin sulfate proteoglycan in nervous tissue. I. Adult brain, retina, and peripheral nerve, *The Journal of cell biology*, 99 (1984) 1117-1129.
- [55] J. Zuo, Y.J. Hernandez, D. Muir, Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite - inhibiting activity is up - regulated following peripheral nerve injury, *Journal of neurobiology*, 34 (1998) 41-54.
- [56] J. Zuo, D. Neubauer, J. Graham, C.A. Krekoski, T.A. Ferguson, D. Muir, Regeneration of axons after nerve transection repair is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan, *Experimental neurology*, 176 (2002) 221-228.
- [57] C.A. Krekoski, D. Neubauer, J. Zuo, D. Muir, Axonal regeneration into acellular nerve grafts is enhanced by degradation of chondroitin sulfate proteoglycan, *The Journal of Neuroscience*, 21 (2001) 6206-6213.
- [58] Y. Wang, H. Jia, W.-Y. Li, X.-J. Tong, G.-B. Liu, S.-W. Kang, Synergistic effects of bone mesenchymal stem cells and chondroitinase ABC on nerve regeneration after acellular nerve allograft in rats, *Cellular and molecular neurobiology*, 32 (2012) 361-371.
- [59] A. Anselin, J. Pollard, Immunopathological factors in peripheral nerve allograft rejection: quantification of lymphocyte invasion and major histocompatibility complex expression, *Journal of the neurological sciences*, 96 (1990) 75-88.
- [60] C. Ide, K. Tohyama, K. Tajima, K. Endoh, K. Sano, M. Tamura, A. Mizoguchi, M. Kitada, T. Morihara, M. Shirasu, Long acellular nerve transplants for allogeneic grafting and the effects of basic fibroblast growth factor on the growth of regenerating axons in dogs: a preliminary report, *Experimental neurology*, 154 (1998) 99-112.
- [61] Z. Li, J. Peng, G. Wang, Q. Yang, H. Yu, Q. Guo, A. Wang, B. Zhao, S. Lu, Effects of local release of hepatocyte growth factor on peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts, *Experimental neurology*, 214 (2008) 47-54.

- [62] H. Yu, J. Peng, Q. Guo, L. Zhang, Z. Li, B. Zhao, X. Sui, Y. Wang, W. Xu, S. Lu, Improvement of peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts with local release of nerve growth factor, *Microsurgery*, 29 (2009) 330-336.
- [63] S.E. Mackinnon, C.B. Novak, Nerve transfers. New options for reconstruction following nerve injury, *Hand clinics*, 15 (1999) 643-666, ix.
- [64] M.K. Porayko, S.C. Textor, R.A. Krom, J.E. Hay, G.J. Gores, T.M. Richards, P.H. Crotty, S.J. Beaver, J.L. Steers, R.H. Wiesner, Nephrotoxic effects of primary immunosuppression with FK-506 and cyclosporine regimens after liver transplantation, in: *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 69, Elsevier, 1994, pp. 105-111.
- [65] T.M. Myckatyn, S.E. MacKinnon, A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction, *Neurological research*, 26 (2004) 124-138.
- [66] R.W. Hiles, Freeze dried irradiated nerve homograft: a preliminary report, *The Hand*, 4 (1972) 79-84.
- [67] P. Johnson, R. Duhamel, E. Meezan, K. Brendel, Preparation of cell - free extracellular matrix from human peripheral nerve, *Muscle & nerve*, 5 (1982) 335-344.
- [68] M. Sondell, G. Lundborg, M. Kanje, Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction, *Brain research*, 795 (1998) 44-54.
- [69] X. Wang, W. Hu, Y. Cao, J. Yao, J. Wu, X. Gu, Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft, *Brain*, 128 (2005) 1897-1910.
- [70] M. Szyndrak, S.W. Kemp, M.D. Wood, T. Gordon, G.H. Borschel, Experimental and clinical evidence for use of decellularized nerve allografts in peripheral nerve gap reconstruction, *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19 (2012) 83-96.
- [71] T.W. Hudson, S. Zawko, C. Deister, S. Lundy, C.Y. Hu, K. Lee, C.E. Schmidt, Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration, *Tissue engineering*, 10 (2004) 1641-1651.
- [72] R.J. Nagao, S. Lundy, Z.Z. Khaing, C.E. Schmidt, Functional characterization of optimized acellular peripheral nerve graft in a rat sciatic nerve injury model, *Neurological research*, (2013).
- [73] D. Muir, The potentiation of peripheral nerve sheaths in regeneration and repair, *Experimental neurology*, 223 (2010) 102-111.
- [74] G. Keilhoff, A. Goehl, F. Stang, G. Wolf, H. Fansa, Peripheral nerve tissue engineering: autologous Schwann cells vs. transdifferentiated mesenchymal stem cells, *Tissue engineering*, 12 (2006) 1451-1465.
- [75] L. de Girolamo, E. Lucarelli, G. Alessandri, M. Antonietta Avanzini, M. Ester Bernardo, E. Biagi, A. Teresa Brini, G. D'Amico, F. Fagioli, I. Ferrero, Mesenchymal stem/stromal cells: a new "cells as drugs" paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy, *Current pharmaceutical design*, 19 (2013) 2459-2473.
- [76] J. Hu, Q.-T. Zhu, X.-L. Liu, Y.-b. Xu, J.-K. Zhu, Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells, *Experimental neurology*, 204 (2007) 658-666.
- [77] D. Wang, X.-L. Liu, J.-K. Zhu, L. Jiang, J. Hu, Y. Zhang, L.-M. Yang, H.-G. Wang, J.-H. Yi, Bridging small-gap peripheral nerve defects using acellular nerve allograft implanted with autologous bone marrow stromal cells in primates, *Brain research*, 1188 (2008) 44-53.
- [78] Z. Zhao, Y. Wang, J. Peng, Z. Ren, S. Zhan, Y. Liu, B. Zhao, Q. Zhao, L. Zhang, Q. Guo, Repair of nerve defect with acellular nerve graft supplemented by bone marrow stromal cells in mice, *Microsurgery*, 31 (2011) 388-394.
- [79] Z. Ren, Y. Wang, J. Peng, Q. Zhao, S. Lu, Role of stem cells in the regeneration and repair of peripheral nerves, *Reviews in the Neurosciences*, 23 (2012) 135-143.
- [80] D. Wang, X.-L. Liu, J.-K. Zhu, J. Hu, L. Jiang, Y. Zhang, L.-M. Yang, H.-G. Wang, Q.-T. Zhu, J.-H. Yi, Repairing large radial nerve defects by acellular nerve allografts seeded with autologous bone marrow stromal cells in a monkey model, *Journal of neurotrauma*, 27 (2010) 1935-1943.
- [81] G. Liu, Y. Cheng, S. Guo, Y. Feng, Q. Li, H. Jia, Y. Wang, L. Tong, X. Tong, Transplantation of adipose-derived stem cells for peripheral nerve repair, *International journal of molecular medicine*, 28 (2011) 565-572.

- [82] L. Jiang, Y. Zheng, O. Chen, T. Chu, J. Ding, Q. Yu, Nerve defect repair by differentiated adipose-derived stem cells and chondroitinase ABC-treated acellular nerves, *International Journal of Neuroscience*, (2015) 1-9.
- [83] E.W. Wang, J. Zhang, J.H. Huang, Repairing peripheral nerve injury using tissue engineering techniques, *Neural regeneration research*, 10 (2015) 1393.
- [84] S.-C. Zhang, M. Wernig, I.D. Duncan, O. Brüstle, J.A. Thomson, In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells, *Nature biotechnology*, 19 (2001) 1129-1133.
- [85] M. Van der Rest, R. Garrone, Collagen family of proteins, *The FASEB journal*, 5 (1991) 2814-2823.
- [86] S.F. Badylak, Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction, *Transplant immunology*, 12 (2004) 367-377.
- [87] C.A. McDevitt, G.M. Wildey, R.M. Cutrone, Transforming growth factor - β 1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67 (2003) 637-640.
- [88] E.H. Javazon, K.J. Beggs, A.W. Flake, Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging, *Experimental hematology*, 32 (2004) 414-425.
- [89] M. Di Nicola, C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanesi, P.D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, A.M. Gianni, Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli, *Blood*, 99 (2002) 3838-3843.
- [90] A. Bartholomew, C. Sturgeon, M. Siatskas, K. Ferrer, K. McIntosh, S. Patil, W. Hardy, S. Devine, D. Ucker, R. Deans, Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo, *Experimental hematology*, 30 (2002) 42-48.
- [91] M. Krampera, S. Glennie, J. Dyson, D. Scott, R. Laylor, E. Simpson, F. Dazzi, Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide, *Blood*, 101 (2003) 3722-3729.
- [92] K. Le Blanc, L. Tammik, B. Sundberg, S. Haynesworth, O. Ringden, Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex, *Scandinavian journal of immunology*, 57 (2003) 11-20.
- [93] S. Aggarwal, M.F. Pittenger, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood*, 105 (2005) 1815-1822.
- [94] X.-X. Jiang, Y. Zhang, B. Liu, S.-X. Zhang, Y. Wu, X.-D. Yu, N. Mao, Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells, *Blood*, 105 (2005) 4120-4126.
- [95] S. Beyth, Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, E. Galun, J. Rachmilewitz, Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness, *Blood*, 105 (2005) 2214-2219.
- [96] A. Corcione, F. Benvenuto, E. Ferretti, D. Giunti, V. Cappiello, F. Cazzanti, M. Risso, F. Gualandi, G.L. Mancardi, V. Pistoia, Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions, *Blood*, 107 (2006) 367-372.
- [97] L. Raffaghello, G. Bianchi, M. Bertolotto, F. Montecucco, A. Busca, F. Dallegri, L. Ottonello, V. Pistoia, Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche, *Stem cells*, 26 (2008) 151-162.
- [98] F. Locatelli, R. Maccario, F. Frassoni, Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders?, *Haematologica*, 92 (2007) 872-877.
- [99] A. Uccelli, L. Moretta, V. Pistoia, Mesenchymal stem cells in health and disease, *Nature Reviews Immunology*, 8 (2008) 726-736.
- [100] G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, J. Middleton, Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing, *Stem cells*, 25 (2007) 2739-2749.
- [101] B. Kazmi, C.J. Inglefield, M.P. Lewis, Autologous Cell Therapy: Current Treatments and Future Prospects, *Wounds*, 21 (2009) 234-242.
- [102] S. Hermanns, G. Wunderlich, C. Rosenbaum, C.O. Hanemann, H.W. Müller, C.C. Stichel, Lack of immune responses to immediate or delayed implanted allogeneic and xenogeneic Schwann cell suspensions, *Glia*, 21 (1997) 299-314.

- [103] A. Mosahebi, P. Fuller, M. Wiberg, G. Terenghi, Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration, *Experimental neurology*, 173 (2002) 213-223.
- [104] L.M. Yang, X.L. Liu, Q.T. Zhu, Y. Zhang, T.F. Xi, J. Hu, C.F. He, L. Jiang, Human peripheral nerve - derived scaffold for tissue - engineered nerve grafts: Histology and biocompatibility analysis, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 96 (2011) 25-33.
- [105] D.N. Brooks, R.V. Weber, J.D. Chao, B.D. Rinker, J. Zoldos, M.R. Robichaux, S.B. Ruggeri, K.A. Anderson, E.E. Bonatz, S.M. Wisotsky, Processed nerve allografts for peripheral nerve reconstruction: a multicenter study of utilization and outcomes in sensory, mixed, and motor nerve reconstructions, *Microsurgery*, 32 (2012) 1-14.
- [106] X.-y. Li, H.-l. Hu, J.-r. Fei, X. Wang, T.-b. Wang, P.-x. Zhang, H. Chen, One-stage human acellular nerve allograft reconstruction for digital nerve defects, *Neural regeneration research*, 10 (2015) 95.
- [107] S. Zhu, J. Liu, C. Zheng, L. Gu, Q. Zhu, J. Xiang, B. He, X. Zhou, X. Liu, Analysis of human acellular nerve allograft reconstruction of 64 injured nerves in the hand and upper extremity: a 3 year follow - up study, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, (2016).
- [108] Z.C. Gersey, S.S. Burks, K.D. Anderson, M. Dididze, A. Khan, W.D. Dietrich, A.D. Levi, First human experience with autologous Schwann cells to supplement sciatic nerve repair: report of 2 cases with long-term follow-up, *Neurosurgical Focus*, 42 (2017) E2.
- [109] A. Arreola Romero, Células mesenquimales humanas diferenciadas in vitro a células de schwann, in, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2011.
- [110] M. García-Pérez, H. Martínez-Rodríguez, G. López-Guerra, A. Soto-Domínguez, S. Said-Fernández, R. Morales-Avalos, R. Elizondo-Omaña, R. Montes-de-Oca-Luna, S. Guzmán-López, M. Castillo-Galván, A modified chemical protocol of decellularization of rat sciatic nerve and its recellularization with mesenchymal differentiated schwann-like cells: morphological and functional assessments, *Histology and histopathology*, (2016) 11844.
- [111] L. Guerra, G. Guadalupe, Descelularización de nervio ciático de rata y su posterior recelularización in vitro con células de Schwann, in, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2014.
- [112] W. Wang, S. Itoh, K. Takakuda, Comparative study of the efficacy of decellularization treatment of allogenic and xenogeneic nerves as nerve conduits, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104 (2016) 445-454.
- [113] M. Olausson, P.B. Patil, V.K. Kuna, P. Chougule, N. Hernandez, K. Methe, C. Kullberg-Lindh, H. Borg, H. Ejnell, S. Sumitran-Holgersson, Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study, *The Lancet*, 380 (2012) 230-237.
- [114] M. Brown, E. Lunn, V. Perry, Consequences of slow Wallerian degeneration for regenerating motor and sensory axons, *Journal of neurobiology*, 23 (1992) 521-536.
- [115] J. Colavincenzo, R. Levine, Myelin debris clearance during Wallerian degeneration in the goldfish visual system, *Journal of neuroscience research*, 59 (2000) 47-62.
- [116] J.M. Ruckh, J.-W. Zhao, J.L. Shadrach, P. van Wijngaarden, T.N. Rao, A.J. Wagers, R.J. Franklin, Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system, *Cell stem cell*, 10 (2012) 96-103.
- [117] H. Neumann, M. Kotter, R. Franklin, Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration, *Brain*, 132 (2009) 288-295.
- [118] M.E. Salazar - Leal, M. Flores, J. Sepulveda - Saavedra, V.J. Romero - Diaz, E.M. Becerra - Verdin, V.A. Tamez - Rodriguez, H.R. Martinez, A. Piñeyro - Lopez, M. Bermudez, An experimental model of peripheral neuropathy induced in rats by *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) fruit, *Journal of the Peripheral Nervous System*, 11 (2006) 253-261.
- [119] J.M. Wallis, Z.D. Borg, A.B. Daly, B. Deng, B.A. Ballif, G.B. Allen, D.M. Jaworski, D.J. Weiss, Comparative assessment of detergent-based protocols for mouse lung de-cellularization and re-cellularization, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18 (2012) 420-432.
- [120] C. Ide, K. Tohyama, R. Yokota, T. Nitatori, S. Onodera, Schwann cell basal lamina and nerve regeneration, *Brain research*, 288 (1983) 61-75.

- [121] S. Walsh, R. Midha, Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair, *Neurosurgical focus*, 26 (2009) E2.
- [122] L. Fan, Z. Yu, J. Li, X. Dang, K. Wang, Schwann-like cells seeded in acellular nerve grafts improve nerve regeneration, *BMC musculoskeletal disorders*, 15 (2014) 165.
- [123] M.E. Ràfols, Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional, *Endocrinología y Nutrición*, 61 (2014) 100-112.
- [124] G. Pavlova, T. Lopatina, N. Kalinina, E. Rybalkina, Y. Parfyonova, V. Tkachuk, A. Revishchin, In vitro neuronal induction of adipose-derived stem cells and their fate after transplantation into injured mouse brain, *Current medicinal chemistry*, 19 (2012) 5170-5177.
- [125] A. Abdanipour, T. Tiraihi, Induction of adipose-derived stem cell into motoneuron-like cells using selegiline as preinducer, *Brain research*, 1440 (2012) 23-33.
- [126] P.J. Kingham, D.F. Kalbermatten, D. Mahay, S.J. Armstrong, M. Wiberg, G. Terenghi, Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro, *Experimental neurology*, 207 (2007) 267-274.
- [127] S.R. Strasberg, M.C. Hertl, S.E. Mackinnon, C.K. Lee, O. Watanabe, G. Tarasidis, D.A. Hunter, P. Wong, Peripheral nerve allograft preservation improves regeneration and decreases systemic cyclosporin A requirements, *Experimental neurology*, 139 (1996) 306-316.
- [128] J. Casañas, J. de la Torre, F. Soler, F. García, C. Rodellar, M. Pumarola, J. Climent, R. Soler, L. Orozco, Peripheral nerve regeneration after experimental section in ovine radial and tibial nerves using synthetic nerve grafts, including expanded bone marrow mesenchymal cells: morphological and neurophysiological results, *Injury*, 45 (2014) S2-S6.
- [129] C. Radtke, C. Allmeling, K.-H. Waldmann, K. Reimers, K. Thies, H.C. Schenk, A. Hillmer, M. Guggenheim, G. Brandes, P.M. Vogt, Spider silk constructs enhance axonal regeneration and remyelination in long nerve defects in sheep, *PloS one*, 6 (2011) e16990.
- [130] V. Kumar, A.K.F. Abbas, *Patología estructural y funcional de Robbins y Cotran*, in, 2010.
- [131] R.H. Xia, N. Yosef, E.E. Ubogu, Clinical, electrophysiological and pathologic correlations in a severe murine experimental autoimmune neuritis model of Guillain-Barré syndrome, *Journal of neuroimmunology*, 219 (2010) 54-63.

ANEXOS

1. Técnicas morfológicas para la preparación del AA

1.1 Técnica histológica convencional

I. Fijación

Sumergir las muestras en glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilatos por 24h a 4°C, al cabo de este período cambiar el fijador por PBS 1X pH 7.4. Enseguida, el tejido se colocó en un cassette de inclusión, se rotuló y se dejó en agua destilada.

Glutaraldehído 2.5%

Glutaraldehído 25%..... 10 mL

Buffer de cacodilatos..... 90 mL

Buffer de cacodilatos 0.1M pH 7.4

Solución A

Cacodilato de Na..... 4.28 g

Agua destilada..... 100 mL

Solución B

Ácido clorhídrico..... 0.5 mL

Agua destilada..... 25 mL

Solución de trabajo

Solución A..... 100 mL

Solución B 5.4 mL

II. Procesamiento

Las muestras se lavaron y mediante un histoquinete se deshidrataron, aclararon y se preincluyeron en parafina:

- a) Deshidratar en alcoholes graduales, 1h en cada uno (70, 80, 96, 96, 100 y 100%)
- b) Transferir a una solución de alcohol-xilol (1:1) por 1h.
- c) Pasar a xilol al 100% por 1h (dos cambios).
- d) Por último, llevar a parafina líquida por 1h (tres cambios).

III. Inclusión, microtomía y montaje

Enseguida, los cassettes con las muestras de tejido se llevaron a la estación de inclusión y se sometieron al baño de calor; el tejido se colocó de manera conveniente en un molde de inclusión, se puso encima la base del cassette y mediante el dispensador de parafina se rellenó el molde para hacer los bloques de tejido. Los bloques se llevaron a la cámara fría para alcanzar la consistencia necesaria para su posterior corte en secciones muy finas mediante microtomo. Por último, los cortes histológicos se llevaron a un baño de flotación, se levantaron en laminillas previamente rotuladas y se dejaron secar en la estufa a 60°C por al menos 30min.

1.2 Desparafinado e hidratación

1. Sumergir las laminillas en xilol al 100% por 5min.
2. Transferirlas a alcohol-xilol (1:1) por 5min.
3. Llevar a alcoholes graduales, 2 min en cada uno (100, 100, 96, 96 y 80%).
4. Por último, colocar las laminillas en agua destilada por 2 min.
5. Realizar la técnica de tinción pertinente.

1.3 Deshidratación, aclaración y montaje

Realizar diez inmersiones en:

- a) 2 cambios de alcohol al 96%
- b) 2 cambios de alcohol al 100%
- c) alcohol-xilol (1:1)
- d) xilol al 100%

Las laminillas se dejaron secar dentro de la campana de extracción de gases. Enseguida, se tomaron las laminillas por un extremo, se sumergieron en xilol y se eliminó el exceso para poner una gota de resina Entellan y colocar cuidadosamente un cubreobjetos.

1.4 Tinciones

a) H y E

Cortes: 4 μ m

PROTOCOLO

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 1.2).
2. Pasar las laminillas a hematoxilina por 2 min.
3. Lavar con agua corriente, enjuague lento.
4. Realizar una inmersión rápida en alcohol ácido (5 s).
5. Lavar con agua corriente, enjuague lento.
6. Realizar 2 inmersiones rápidas en agua amoniacal 1% (5 s).
7. Lavar con agua corriente, enjuague lento.
8. Enjuagar con agua destilada.
9. Realizar 6 inmersiones en Eosina.
10. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 1.3).

REACTIVOS

Hematoxilina de Gil

Agua destilada 730 mL
 Etilenglicol 250 mL
 Hematoxilina anhidra..... 2 g
 Yodato de potasio 0.2 g
 Sulfato de aluminio 17.6 g
 Ácido acético glacial 2 mL

La solución se prepara en el orden en que están listado los reactivos y se mezclan con ayuda de un agitador magnético a TA durante 1 h. Filtrar (papel filtro Whatman® 20-30 μ M) la primera vez antes de usar.

Eosina

Eosina amarillenta 1 g
 Agua destilada 20 mL
 Alcohol 96° 80 mL

De esta solución concentrada, tomar una parte y agregarla en tres partes de alcohol 80°. Antes de usar, agregar 0.5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de colorante preparado, agitar.

Solución de Alcohol-Ácido

Ácido clorhídrico concentrado..... 1 mL

Alcohol 70° 99 mL

Solución de Agua Amoniacal

NaH₄OH..... 1 mL

Agua destilada..... 99 mL

RESULTADOS

Núcleos: azul violeta

Citoplasma y fibras de colágeno: rojo-rosado

b) TCM

Cortes: 4 µm

PROTOCOLO

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 1.2).
2. Usar como mordente el fijador de Bouin por 60 min a 60°C. Al cabo de este tiempo, dejar enfriar por un par de minutos, lavar con H₂O corriente hasta que el color amarillo desaparezca y dar un enjuague final con H₂O destilada.
3. Pasar a la solución de Hematoxilina férrica de Weigert durante 15 min, enseguida lavar con H₂O corriente hasta que ésta deje de teñirse y dar un enjuague final con H₂O destilada.
4. Teñir con la solución de Fucsina-Escarlata por 5s y lavar con H₂O corriente hasta que ésta deje de teñirse.
5. Pasar los cortes a la solución de Ácidos Fosfomolibdico-Fosfotúngstico durante 10 min y enjuagar brevemente con H₂O destilada.
6. Colorear con la solución de Azul de Anilina durante 15 s y lavar con H₂O corriente hasta eliminar el exceso de colorante.
7. Pasar al Ácido Acético- acuoso por 2 min.
8. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 1.3).

REACTIVOS

Hematoxilina férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina (anhidra).....1 g
Alcohol 96°.....100 mL

Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29%4 mL
Agua destilada95 mL
Ácido clorhídrico concentrado.....1 mL

Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de la solución A y de la B.

Solución de Fuscina ácida y Escarlata de Biebrich

Escarlata de Biebrich acuosa al 1%..... 90 mL
Fuscina ácida acuosa al 1%..... 10 mL
Ácido acético glacial.....1 mL

Solución de Ácidos Fosfomolibdico y Fosfotúngstico

Ácido Fosfomolibdico.....5 g
Ácido Fosfotúngstico..... 5 g
Agua destilada 200 mL

Solución de Azul de Anilina

Azul de anilina 2.5 g
Agua destilada.....100 mL
Ácido acético glacial 2 mL

Solución acuosa de Ácido Acético al 1%

Ácido acético glacial 1 mL
Agua destilada..... 99 mL

Solución Fijadora de Bouin

Solución acuosa saturada de Ácido Pícrico... 75 mL

Formaldehído..... 25 mL

Ácido acético glacial 5 mL

NOTA

La solución acuosa de Escarlata-Biebrich se prepara teniendo 1g del colorante disuelto en 100 mL de agua destilada. Y la solución acuosa de la fucsina ácida se obtiene disolviendo 1g del reactivo mencionado en 100 mL de agua destilada.

La solución acuosa de cloruro férrico se prepara pesando 14.5 g de éstos cristales y luego se disuelven en 50 mL de agua destilada, y de ésta mezcla se toman los 4 mL que se requieren para preparar el reactivo requerido, el sobrante se guarda en un recipiente adecuado.

Se recomienda que la solución colorante de hematoxilina sea renovada con cierta frecuencia, sobre todo después de varios usos, para garantizar una adecuada tinción y diferenciación de los componentes tisulares.

RESULTADOS

Núcleos: café oscuro a negro

Citoplasma, queratina y fibras musculares: tonos rojizos

Fibras de colágeno y mucus: azul oscuro y claro

c) M-TCM

Cortes: 4 µm

PROTOCOLO

1. Desparaafinar e hidratar preparaciones (anexo 1.2).
2. Usar como mordente el fijador de Bouin por 60 min a 60°C. Al cabo de este tiempo, dejar enfriar por un par de minutos, lavar con H₂O corriente hasta que el color amarillo desaparezca y dar un enjuague final con H₂O destilada.
3. Pasar a la solución de Hematoxilina férrica de Weigert durante 15 min, enseguida lavar con H₂O corriente hasta que ésta deje de teñirse y dar un enjuague final con H₂O destilada.
4. Pasar los cortes a la solución de Ácidos Fosfomolibdico-Fosfotúngstico durante 10 min y enjuagar brevemente con H₂O destilada.

5. Colorear con la solución de Azul de Anilina durante 15 s y lavar con H₂O corriente hasta eliminar el exceso de colorante.
6. Pasar al Ácido Acético- acuoso por 2 min.
7. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 1.3).

d) K-B

Cortes: 7 µm

PROTOCOLO

1. Desparafinar las preparaciones , llevándolas sólo hasta alcohol al 80%
2. Pasar las laminillas a solución de luxol fast blue 0.1% y dejar toda la noche a TA o en estufa a 60°C durante 90 minutos.
3. Enjuagar en alcohol 96° para remover el exceso de colorante.
4. Lavar en agua destilada hasta que deje de teñirla.
5. *Revisar al microscopio y revisar el grado de sobrecoloración.
6. Diferenciar enseguida por medio de una inmersión rápida en solución de carbonato de litio 0.05% (5-10s).
7. Lavar con agua destilada.
8. Sumergir las laminillas en solución de Violeta de Cresilo 0.1%, 5 - 10 min.
9. Enjuagar y diferenciar con una inmersión rápida en 2 cambios de alcohol 96°.
10. Deshidratar, aclarar y montar , a partir de alcohol absoluto (anexo 1.3).

REACTIVOS

Solución de Luxol Fast Blue al 0.1%

Luxol F.B. (Merck o Sigma)..... 0.1 g

Alcohol 96°.....100 mL

Disolver el colorante en el alcohol adicionar 0.5 mL de ácido acético al 10% ,previamente preparado, por cada 100 mL de solución estable.

Solución de Violeta de Cresilo al 0.1 %

Violeta de Cresilo q.p..... 0.1 g

Agua destilada 100 mL

Después de preparada se adicionan 10 gotas de ácido acético glacial o concentrado y la solución se filtra.

Solución de Carbonato de Litio al 0.05%

Carbonato de Litio..... 0.05 g

Agua destilada 100 mL

RESULTADOS

Mielina: azul intenso

Células nerviosas y gliales: rosa a violeta

e) PAS

Cortes: 4 μ m

PROTOCOLO

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 1.2).
2. Sumergir los cortes en la solución del ácido peryódico por 5 min. Enjuagar en H₂O corriente.
3. Sumergir los cortes en el reactivo de Schiff por 25 min a 60°C y lavar con H₂O corriente. Revisar que tomen el color rosa pálido.
4. Diferenciar los cortes en baño sulfuroso (inmersión rápida). Enjuagar en H₂O corriente.
5. Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 2min. Enjuagar en H₂O corriente.
6. Decolorar en alcohol ácido (inmersión rápida) y lavar con H₂O corriente.
7. Virar con H₂O amoniacal y lavar con H₂O corriente.
8. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 1.3).

REACTIVOS

Solución del ácido peryódico al 0.5%.

Agua destilada.....100 mL

Ácido periódico..... 0.5g

Solución de baño sulfuroso

Agua destilada..... 100 mL

Ácido clorhídrico (HCl) 1N 5 mL

Metabisulfito sódico al 10%..... 6 mL

Solución de metabisulfito al 10%

Disolver 10 g del reactivo en 100 mL de agua destilada.

Solución de ácido clorhídrico 1N

Disolver 8.35 mL del ácido en 91.65 mL de agua destilada.

Solución del reactivo de Schiff

Reactivo comercial (Sigma-Aldrich®, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA).

RESULTADOS

Núcleos: Violeta, negro

Polisacáridos simples (glucógeno), mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas, LE, glucolípidos: rosa a violeta-púrpura

1.5 Impregnación argéntica

f) M-G-E

Cortes: 10 µm

PROTOCOLO

1. Desparafinar e hidratar preparaciones (anexo 1.2).
2. Lavar en agua destilada 3 min, 2 cambios.
3. Realizar una inmersión en nitrato de plata por 45 min a 37°C.
4. Lavar en formalina al 10% por 15 s.
5. Colocar en AgNO₃ amoniacal por 90 s.
6. Lavar en formalina al 10% por 1 min.
7. Enjuagar con agua destilada 3 min, 2 cambios.
8. Fijar la reacción con tiosulfato de sodio al 5% durante 5 min.
9. Enjuagar con agua destilada por 3 min.
10. Deshidratar, aclarar y montar (anexo 1.3).

REACTIVOS

Solución de Nitrato de Plata (AgNO₃) al 20%

AgNO₃..... 6 g

Agua destilada 30 mL

Proteger la solución de la luz

Solución de AgNO_3 amoniacal

AgNO_3 al 20%..... 30 mL

Etanol Absoluto..... 20 mL

A la solución anterior se le adiciona Hidróxido de Amonio (NH_4OH) concentrado gota a gota, hasta que se forme un precipitado café. Éste se continua adicionando hasta que el precipitado se disuelva y finalmente se agregan 5 gotas más.

Solución de Tiosulfato de Sodio al 5%

Tiosulfato de Sodio..... 5 g

Agua destilada 100 mL

RESULTADOS

Axones: marrón, oscuro

2. Medios y soluciones para cultivo celular

2.1 Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) 1X pH 7.4

En 500 mL de agua destilada (dH₂O), disolver:

Cloruro de Potasio (KCl).....	0.106 g
Fosfato de Potasio Monobásico (KH ₂ PO ₄).....	0.102 g
Cloruro de Sodio (NaCl).....	4.090 g
Fosfato de Disodio (Na ₂ HPO ₄).....	0.798 g

Se colocan las sales en un vaso de precipitados adecuado para el volumen de la solución a preparar, se añade el 80% del dH₂O y se mezcla con ayuda de un agitador magnético hasta diluir las sales. Ajustar el pH a 7.4 con Ácido clorhídrico (HCl) 1M e Hidróxido de Sodio (NaOH) 10 M. Aforar la solución al volumen final requerido y filtrar a través de una unidad de filtración de 45 µm y/o esterilizar en autoclave. Bajo técnica aséptica distribuir en alícuotas de 50 mL en tubos cónicos y almacenar a 4°C.

HCl 1M

HCl concentrado.....	8.62 mL
dH ₂ O.....	91.00 mL

No agregar el dH₂O al ácido. Mezclar en una plancha agitadora por 5 min. Aforar a 100mL con dH₂O.

NaOH 10M

NaOH.....	40 g
dH ₂ O.....	40 mL

Mezclar en una plancha agitadora con una barra magnética hasta disolver el NaOH por completo. Aforar a 100mL.

2.2 PBS 1X suplementado

Suplementado con Gentamicina y Penicilina-Streptomycin (Gibco[®], Gran Island, NY, 14072) a 50 µg/mL y Fungizone[®] a 2.5 µg/mL (Gibco[®]).

PBS 1X pH 7.4	50 mL
Gentamicina 10 mg/mL.....	250 µL
Penicilina-Streptomycin 10 mg/mL....	250 µL
Fungizone [®] , 250 µg/mL.....	50 µL

2.3 PBS 1X suplementado para cultivo celular

Suplementado con Gentamicina (Gibco[®], Gran Island, NY, 14072) a 50 µg/mL y Fungizone[®] a 2.5 µg/mL (Gibco[®]).

PBS 1X pH 7.4	50 mL
Gentamicina 10 mg/mL.....	250 µL
Fungizone [®] , 250 µg/mL.....	50 µL

2.4 Colagenasa I al 0.2%

Suplementada con Gentamicina a 50 µg/mL y Fungizone[®] a 2.5 µg/mL.

Colagenasa tipo I 285 U/mg (Gibco [®]).....	0.04 g
PBS 1X	20.00 mL
Gentamicina 10 mg/mL.....	100 µL
Fungizone [®] , 250 µg/mL.....	20 µL

Filtrar la solución a través de discos de 45µm antes de adicionar antibiótico y antimicótico. Proteger de la luz y almacenar a 4°C.

2.5 Medio completo

Se emplea el medio mínimo esencial MEM alpha (1X) + GlutaMAX[™] -I (Gibco[®]) suplementado con SBF (Gibco[®]) al 10% , Gentamicina a 50µg/mL y Fungizone[®] a 2.5 µg/mL.

Medio 45 mL
 SBF..... 5 mL
 Gentamicina 10 mg/mL..... 250 µL
 Fungizone[®], 250 µg/mL..... 50 µL

Almacenar a 4°C

2.6 Azul tripano al 0.2%

Azul tripano 0.4% (Sigma-Aldrich[®] St. Louis, MO 63103 EUA)..... 0.5g
 PBS 1X 1mL

3. Soluciones y reactivos para inmunohistoquímica

3.1 Tris – buffer salino + tween 20 1X (TBST)

Opción 1: casero

TBS 10X

NaCl 102.66g

Tris Base..... 14.45g

Ajustar pH a 7.4, aforar a 1 L con dH₂O y filtrar.

TBST 1X

TBS 10X..... 100 mL

dH₂O 900 mL

Tween 20500 µL

Opción 2: comercial

TBST 1X

TBST 20X (Abcam®).... 50 mL

dH₂O 950 mL

3.2 Silanizado de laminillas

NOTA: sólo utilizar instrumental de plástico

Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich®) 5 mL

dH₂O 45 mL

- a) Mezclar los componentes y pasar a una jarra tipo coplin de polipropileno.
- b) Sumergir las laminillas a tratar por 10 min.
- c) Dejar secar a TA.